

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

Graduate Institute of Chemical and Materials Engineering

Tunghai University

碩士論文

發展可供感染性生物材料快速檢測之拉曼指紋圖譜技術

**A novel Raman fingerprint technology for rapid analysis
of infectious biological materials**

研究生：張嘉紋 撰

指導教授：林其昌 博士

中華民國 101 年 7 月

July, 2012

摘要

在人類環境中普遍存在各種微生物，然而當人類免疫力下降時，感染型細菌開始伺機而動，進而造成人類感染甚至死亡。由於醫療上之抗生素廣泛使用，近年來許多抗藥性菌株的出現明顯增加，亦使得臨床診斷與治療的困難度增加。通常當病人前往臨床門診就醫時，病灶的微生物培養結果常為提供醫師診斷以及調整治療藥物使用的重要參考情資，然繁瑣耗時的微生物培養過程卻需要花費數天至數周的時間。於是本研究希望能夠發展一種快篩工具—「微生物拉曼光譜指紋技術」，在快速及微量樣本之檢測限制原則下，協助醫師於第一時間掌握更多的感染資訊以利於更正確的診斷及用藥，更能減少病患治療時間及藥物資源浪費。

本研究主要分為三個部分：(1)利用拉曼光譜分析沙門氏菌(*Salmonella*)、鮑式不動桿菌(*Acinetobacter baumannii*)和克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)及其各株之噬菌體；(2)針對 10 株不同鮑式不動桿菌進行拉曼圖譜分析；(3)研究奈米增顯粒子對微生物樣本之拉曼光譜增顯圖譜。首先將針對不同革蘭氏陰性菌圖譜分析，初步結果顯示沙門氏菌之碳水化合物成分明顯高於鮑氏不動桿菌和克雷伯氏菌，而此兩株細菌則在部份官能基呈現有特別差異，此處利用條碼型式更易進行區分與鑑別。以 10 株鮑氏不動桿菌配合其抗藥性測試進行分析，發現其高抗藥性菌株於 1048 cm^{-1} 之特徵峰明顯強於其於特徵峰，而低抗藥性菌株則各特徵峰比例接近，顯示高抗藥性之細胞膜上蛋白質結構有所不同。本研究也應用表面增顯拉曼圖譜，利用奈米金粒子改變尺度 (0.9 ± 0.3 ， 0.8 ± 0.3 和 $0.7\pm 0.3\ \mu\text{m}$)和含金比例(0、2、8、13 和 30%)進行增顯，結果顯示以研磨 45 分鐘($0.7\pm 0.3\ \mu\text{m}$)和含金比例 30%的增顯效果為最佳。

關鍵詞：拉曼光譜、抗藥性、細菌、噬菌體、表面增顯拉曼圖譜

Abstract

There are various microorganisms distributed widely in our nature environment. However, infectious diseases may possible increase while our immuno-system declined. Due to overuse of antibiotics, some bacteria presents their drug-resistant ability and causes the difficulty to clinical treatment. Bacteria culture is a gold standard procedure in clinical diagnostic, however, it also a complex and time consuming procedure. This research focus on a rapid screening tool, Raman spectroscopy which supports characteristics information of infectious bacteria with fast and needs only little amount samples, can be used to assist doctors in the clinical process.

In the study, three bacteria including *Salmonella*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumonia* and their related phages, and other ten *Acinetobacter baumannii* strains were also introduced to analysis of their Raman fingerprint. Otherwise, a novel surface enhancing Raman spectroscopy (SERS) substrate for enhancing finger print signals was also studied as part of this work. As results showed, the contains of carbohydrate in *Salmonella* is much higher than that of *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumonia*. As represented by barcode analysis, these bacteria can be further identified via their characteristic peaks. Raman fingerprints of ten *Acinetobacter baumannii* strains showed significant peak stand at 1048 cm^{-1} was much higher intensity than other peaks in the group of higher-antibiotics resistant. By using gold nanoparticles with different particle size (0.9 ± 0.3 , 0.8 ± 0.3 and $0.7\pm 0.3\ \mu\text{m}$) and the gold contains (0%, 2%, 8%, 13, 30%) as SERS substrates, the best signal enhancement condition can be founded when $0.7\pm 0.3\ \mu\text{m}$ of particle size with 30% of gold contains was used.

Keywords: Raman spectroscopy, drug-resistant, bacteria, phage, surface enhancing Raman spectroscopy (SERS)

誌謝

在兩年中，我成長了不少。首先要謝謝林其昌老師，給予我很多機會實現自我，也給予我很多精神上的鼓勵，這些機會讓我成就了許多我覺得自己不可能做到的事情，原來沒有做不到，只有想不想做到。也謝謝成大醫工所 張憲彰教授給予我機會前往他的實驗室學習，使我體會到不同的學習風氣和正確的學習態度。也謝謝楊怡寬教授，在我們之前遇到困難時，願意傾聽我們的心聲，仔細分析利弊給我們聽，並且給我很多的鼓勵。

在這兩年的研究生涯中有歡笑、淚水、崩潰、榮耀，在不斷的跌倒再站起來的這個過程，我也要謝謝一路陪我走過來的同學及學長姐及學弟妹們，像是泓諭、亮均學長、鴨子、喇扣、施金杉、于萱學姐、西瓜、郁雅、刺刺、花媽、文騰學長、魔神、振宇、思思、佳學學長、小郭、Bibo、玫羽、韋銜…之全體碩二生，實在是族繁不及備載，無論是平常陪我歡笑陪我瘋狂或是在實驗上幫助我很多的各位，我真的很謝謝你們，讓我在這條路上不會這孤單。另外，感謝我的大學同學們，你們的關心我都收到了，特別謝謝小羊在我低潮時總是陪我把酒言歡，對酒當歌。感謝在論文撰寫的漫漫長夜中陪伴的妹雯及悲情三人組的布丁和古小夫，我們終於做到了！

最後，最要感謝的是我的家人，謝謝你們忍受我的臭脾氣和任性。謝謝爸爸辛勞賺錢讓我可以無憂讀書，以及無時無刻的關心，未來我將能替家裡分憂解勞了。以及謝謝弟弟的無限支持，和五年來陪我一路走來的男友，總是能讓我在最焦慮的時候冷靜下來。最終，我也要謝謝我自己，在這一路上沒有輕言放棄，我堅持下來了。我也期許自己未來能以這樣的態度完成未來的每一件事情。

在此，謹將此本論文獻給我在天上的媽媽，我相信，無論我做什麼決定，妳都會永遠支持我，永遠活在我心裡。媽，我做到了！

目錄

摘要.....	I
Abstract.....	II
誌謝.....	III
目錄.....	IV
圖目錄.....	VI
表目錄.....	X
附錄.....	XI
第一章 緒論.....	1
1.1 研究的背景與目的.....	1
1.2 臨床檢測方法及比較.....	2
1.3 文獻回顧.....	4
1.3.1 細菌背景介紹.....	5
1.3.1.1 <i>Klebsiella spp.</i>	5
1.3.1.2 <i>Acinetobacter spp.</i>	7
1.3.1.3 <i>Salmonella spp.</i>	8
1.3.2 噬菌體簡介.....	10
1.3.2.1 噬菌體歷史與簡介.....	10
1.3.2.2 噬菌體的應用.....	11
1.3.2.3 應用噬菌體治療之優點.....	12
1.3.3 拉曼光譜的介紹與原理.....	13
1.3.3.1 拉曼光譜的歷史.....	13
1.3.3.2 拉曼光譜的原理.....	13
1.3.3.3 紅外線光譜儀與拉曼光譜的比較.....	15
1.3.3.4 拉曼光譜的潛力與應用.....	17
1.3.4 拉曼光譜於生醫領域的應用.....	18
1.3.5 表面增顯拉曼光譜.....	29
1.3.5.1 表面增顯拉曼光譜原理.....	29
1.3.5.2 電磁增顯機制.....	29
1.3.5.3 化學增顯機制.....	30
1.4 研究架構.....	31
第二章 研究設備與方法.....	32
2.1 研究設備.....	32

2.3 實驗樣本取得.....	35
2.3.1 細菌和噬菌體.....	35
2.3.2 <i>A. baumannii</i> 菌株.....	35
2.3.3 表面增顯奈米粒子.....	37
2.4 樣本濃度的配置.....	37
2.5 樣品的檢測方式.....	38
2.6 實驗數據處理.....	40
第三章 結果與討論.....	45
3.1 生物樣本指紋圖譜.....	45
3.1.1 細菌指紋圖譜.....	45
3.1.2 噬菌體指紋圖譜比對.....	61
3.1.3 拉曼系統比較.....	77
3.2 <i>A. baumannii</i> 圖譜表現.....	81
3.3 拉曼表面增顯粒子.....	87
3.3.1 改變研磨時間.....	87
3.3.2 含金比例不同.....	96
第四章 結論與未來展望.....	104
附錄.....	106
參考文獻.....	129

圖目錄

圖 1-1 研究背景與目的	3
圖 1-2 文獻回顧脈絡圖	4
圖 1-3 噬菌體之複製行為	10
圖 1-4 拉曼系統能量躍遷圖	14
圖 1-5 紅外線光譜和拉曼光譜的能量躍遷圖	16
圖 1-6 CO ₂ 分子之振動模式	16
圖 1-9 不同菌株之拉曼光譜	21
圖 1-11 各爆發 <i>Acinetobacter</i> strains 菌株的平均圖譜	23
圖 1-12 不同種類的流感菌株拉曼圖譜	24
圖 1-13 噬菌體與其宿主細菌之指紋圖譜	25
圖 1-14 小牛胸腺的拉曼圖譜	27
圖 1-15 拉曼光譜於生醫的應用廣度	28
圖 1-16 表面電漿共振	29
圖 1-17 拉曼光譜於分子金屬的能階躍遷圖	30
圖 1-18 研究架構示意圖	31
圖 2-1 BWTEK 公司 i-Raman 系統	33
圖 2-2 Thermo Fisher SCIENTIFIC 公司的 DXR Raman microscope.....	34
圖 2-3 利用拉曼光譜檢測細菌和噬菌體之實驗流程	39
圖 2-4 加入奈米金之實驗過程	39
圖 2-5 利用 Si 校正光譜所得圖譜	40
圖 2-6 圖譜去除背景螢光	41
圖 2-7 去除背景值後之圖譜平滑化處理	41
圖 2-8 最終所得指紋圖譜	42
圖 2-9 可攜式 i-Raman 之生物樣本訊號(上)與基材訊號(下).....	42
圖 2-10 桌上型拉曼系統所得圖譜	43
圖 2-11 桌上型拉曼系統所得之原圖譜(藍)和去背景值後圖譜(紅).....	44
圖 2-12 桌上型拉曼系統所得圖譜	44

圖 3- 1 Ed2 之單一拉曼光譜.....	45
圖 3- 2 Ed2 圖譜再現性特性(N=5).....	46
圖 3- 3 Ed2 之強度標準差.....	46
圖 3- 4 Ed2 之 400-1100 及 1100-1800 cm^{-1} 光譜組合.....	47
圖 3- 5 NK5 的單一拉曼圖譜.....	48
圖 3- 6 NK5 圖譜再現性特性(N=5).....	48
圖 3- 7 NK5 之強度標準差.....	49
圖 3- 8 NK5 之 400-1100 及 1100-1800 cm^{-1} 光譜組合.....	49
圖 3- 9 KM18 的單一拉曼圖譜.....	50
圖 3- 10 KM18 圖譜再現性特性(N=5).....	50
圖 3- 11 KM18 之強度標準差.....	51
圖 3- 12 KM18 之 400-1100 及 1100-1800 cm^{-1} 光譜組合.....	51
圖 3- 13 Ed2、NK5、KM18 於 400-1100 cm^{-1} 區域之拉曼光譜.....	53
圖 3- 14 Ed2、NK5、KM18 於 1100 -1800 cm^{-1} 區域之拉曼光譜.....	54
圖 3- 15 Ed2、NK5、KM18 於 400-1100 cm^{-1} 區域之拉曼光譜.....	55
圖 3- 16 Ed2、NK5、KM18 於 1100 -1800 cm^{-1} 區域之拉曼光譜.....	55
圖 3- 17 Ed2、NK5、KM18 於 400-1100 cm^{-1} 區域之拉曼光譜.....	56
圖 3- 18 Ed2、NK5、KM18 於 1100 -1800 cm^{-1} 區域之拉曼光譜.....	57
圖 3- 19 特徵峰強度轉換 Barcode 型式.....	60
圖 3- 20 ϕ L2 的單一拉曼圖譜.....	61
圖 3- 21 ϕ L2 圖譜再現性特性(N=5).....	62
圖 3- 22 ϕ L2 之強度標準差.....	62
圖 3- 23 ϕ L2 之 400-1100 及 1100-1800 cm^{-1} 光譜組合.....	63
圖 3- 24 ϕ NK5 的單一拉曼圖譜.....	64
圖 3- 25 ϕ NK5 圖譜再現性特性(N=5).....	64
圖 3- 26 ϕ NK5 之強度標準差.....	65
圖 3- 27 ϕ NK5 之 400-1100 及 1100-1800 cm^{-1} 光譜組合.....	65
圖 3- 28 ϕ KM18 的單一拉曼圖譜.....	66
圖 3- 29 ϕ KM18 圖譜再現性特性(N=5).....	66

圖 3- 30 ϕ KM18 之強度標準差.....	67
圖 3- 31 ϕ KM18 之 400-1100 及 1100-1800 cm^{-1} 光譜組合	67
圖 3- 32 ϕ L2、 ϕ NK5、 ϕ KM18 於 400-1100 cm^{-1} 區域之拉曼光譜	68
圖 3- 33 ϕ L2、 ϕ NK5、 ϕ KM18 於 1100 -1800 cm^{-1} 區域之拉曼光譜	69
圖 3- 34 ϕ L2、 ϕ NK5、 ϕ KM18 於 400-1100 cm^{-1} 區域之拉曼光譜	70
圖 3- 35 ϕ L2、 ϕ NK5、 ϕ KM18 於 1100 -1800 cm^{-1} 區域拉曼光譜	71
圖 3- 36 ϕ L2、 ϕ NK5、 ϕ KM18 於 400-1100 cm^{-1} 區域之拉曼光譜	72
圖 3- 37 ϕ L2、 ϕ NK5、 ϕ KM18 於 1100 -1800 cm^{-1} 區域拉曼光譜	72
圖 3- 38 特徵峰強度轉換 Barcode 型式	76
圖 3- 39 桌上型拉曼系統與可攜式拉曼系統之細菌(KM18)圖譜比較	78
圖 3- 40 桌上型拉曼系統與可攜式拉曼系統之噬菌體(ϕ KM18)圖譜比較	79
圖 3- 41 可攜式系統與桌上型系統之 Barcode 模式	80
圖 3- 42 重複特徵峰之誤差值	80
圖 3- 43 <i>A. baumannii</i> 圖譜表現(400-1100 cm^{-1}).....	82
圖 3- 44 <i>A. baumannii</i> 圖譜表現(1100-1800 cm^{-1}).....	85
圖 3- 45 奈米金粒子光譜	87
圖 3- 46 奈米金粒子 SEM 圖和其粒徑分佈	88
圖 3- 47 水溶液樣本所得之 DTNB 拉曼圖譜	89
圖 3- 48 1 mM DTNB 混合奈米金(15、30 及 45 分鐘)指紋圖譜.....	90
圖 3- 49 不同濃度 DTNB 加入 45 分鐘磨製的奈米金之增顯圖譜	91
圖 3- 50 計算 1340 cm^{-1} 之增顯強度.....	91
圖 3- 51 不同磨製時間之奈米金與 KM18 混合之圖譜.....	93
圖 3- 52 奈米金與細菌結合的分佈情形	93
圖 3- 53 KM18 增顯後強度計算.....	94
圖 3- 54 不同磨製時間之奈米金與 ϕ KM18 混合之圖譜.....	95
圖 3- 55 ϕ KM18 增顯後強度計算.....	95
圖 3- 56 不同含金比例的奈米粒子拉曼圖譜	96
圖 3- 57 奈米金(A)SEM 圖和(B)粒徑分佈圖	97
圖 3- 58 不同含金比例之奈米金粒子和 DTNB(1 mM)混和之 SERS 光譜圖	

.....	98
圖 3- 59 加入不同含金比例奈米金的 DTNB 增顯效果	98
圖 3- 60 KM18 與奈米金(30%)之結合情形.....	99
圖 3- 61 KM18 加入 0%、2%、8%、13%和 30%奈米金之光譜圖	100
圖 3- 62 不同濃度 KM18 加入 8%奈米金之光譜圖	100
圖 3- 63 以 0%和 30%奈米金混合 KM18 之特徵峰強度計算	101
圖 3- 64 ϕ KM18 加入 0%、2%、8%、13%和 30%奈米金之光譜圖	102
圖 3- 65 不同濃度 ϕ KM18 加入 8%奈米金之光譜圖	102
圖 3- 66 以 0%和 30%奈米金混合 ϕ KM18 之特徵峰強度計算	103

表目錄

表 2-2 10 株 <i>A. baumannii</i> 菌株之抗藥資訊	36
表 2-3 奈米金與其樣品配置的比例	38
表 3-1 Ed2、NK5、KM18 的官能基對照和強度比較	58
表 3-3 ϕ L2、 ϕ NK5、 ϕ KM18 的官能基對照和強度比較	74
表 3-4 <i>A. baumannii</i> 圖譜之官能基的統整.....	86

附錄

附錄 1	桌上型拉曼系統與可攜式拉曼系統之 Ed2 圖譜比較	106
附錄 2	桌上型拉曼系統與可攜式拉曼系統之 NK5 圖譜比較	107
附錄 3	桌上型拉曼系統與可攜式拉曼系統之 ϕ L2 圖譜比較	108
附錄 4	桌上型拉曼系統與可攜式拉曼系統之 ϕ NK5 圖譜比較	109
附錄 5	可攜式拉曼系統之 Ed2 單一圖譜	110
附錄 6	可攜式拉曼系統之 Ed2 圖譜再現性特性(N=5)	110
附錄 7	可攜式拉曼系統之 Ed2 強度標準差	111
附錄 8	可攜式拉曼系統之 Ed2 平均光譜圖(N=5)	111
附錄 9	可攜式拉曼系統之 NK5 單一圖譜	112
附錄 10	可攜式拉曼系統之 NK5 圖譜再現性特性(N=5)	112
附錄 11	可攜式拉曼系統之 NK5 強度標準差	113
附錄 12	可攜式拉曼系統之 NK5 平均光譜圖(N=5)	113
附錄 13	可攜式拉曼系統之 KM18 之五條單一圖譜	114
附錄 14	可攜式拉曼系統之 KM18 圖譜再現性特性(N=5)	114
附錄 15	可攜式拉曼系統之 KM18 強度標準差	115
附錄 16	可攜式拉曼系統之 KM18 平均光譜圖(N=5)	115
附錄 17	可攜式拉曼系統之 ϕ L2 之五條單一圖譜	116
附錄 18	可攜式拉曼系統之 ϕ L2 圖譜再現性特性(N=5)	116
附錄 19	可攜式拉曼系統之 ϕ L2 強度標準差	117
附錄 20	可攜式拉曼系統之 ϕ L2 平均光譜圖(N=5)	117
附錄 21	可攜式拉曼系統之 ϕ NK5 之五條單一圖譜	118
附錄 22	可攜式拉曼系統之 ϕ NK5 圖譜再現性特性(N=5)	118
附錄 23	可攜式拉曼系統之 ϕ NK5 強度標準差	119
附錄 24	可攜式拉曼系統之 ϕ NK5 平均光譜圖(N=5)	119
附錄 25	可攜式拉曼系統之 ϕ KM18 之五條單一圖譜	120
附錄 26	可攜式拉曼系統之 ϕ KM18 圖譜再現性特性(N=5)	120
附錄 27	可攜式拉曼系統之 ϕ KM18 強度標準差	121
附錄 28	可攜式拉曼系統之 ϕ KM18 平均光譜圖(N=5)	121
附錄 29	特徵峰整理	122

第一章 緒論

在人類環境中，存在各式各樣的微生物，並且扮演著各種角色。然而由於人類的用藥習慣，使得許多威脅性的微生物產生了抗藥性，而成為現代醫療上更嚴重問題。透過目前臨床檢測方式，在速度上、準確度和靈敏度上，皆還有可改善的空間，倘若在此加入一個輔佐的快篩技術，能在第一時間輔助醫生，給與其一定正確比率的資訊，應能有助其判斷病人病情，亦將能夠節省醫療資源和減少病情延誤的問題產生。

1.1 研究的背景與目的

微生物在人類的環境中，扮演著重要的角色。無論是生態上、食品加工、工業、醫藥、環境皆佔有著重要的位置。然而某些病原性的微生物不可否認的也造成了人類生存的威脅。二次大戰時，抗生素的發明可說是人類的福祉，至今抗生素的應用仍非常的廣泛，例如：農業、動物、人類社會、醫院等皆有抗生素的應用，然由於濫用抗生素和不良的醫療習慣，造成大量抗生素的濫用，使得許多的細菌開始產生抵抗藥物的特性。其中細菌感染在目前醫院中為相當嚴重的問題，然而通常初診時先透過醫生經驗和猜測給予初步的廣效性抗生素，透過細菌培養後確認，於回診時再看是否需要更改用藥，而此種醫療方式則有其風險存在。

在傳統的方法中，受到細菌感染的病患，於初診時，醫生會先從病灶上採集檢體，並由檢體上的組織破片進行培養，即將檢體部分進行革蘭式染色，另一部分送至微生物實驗室進行細胞培養，並將所得結果傳送給醫生。然而細菌培養需要 3~7 天不等的時間和足夠量的樣本，在此期間醫生僅能依據其經驗、染色結果、病灶型態等等資訊進行判斷，所以僅能在第一時間通常先給予廣效性抗生素的投藥，但可能仍會有誤判的情形發生。

所以目前有許多的人力投入於臨床檢測方法的研究，希望能建立快篩機制，使醫生在第一時間能掌握更多更有把握的訊息。本研究嘗試建立拉曼光譜於微生物指紋分析技術進行檢測。拉曼光譜是利用雷射激發物質分子，使分子產生了電子的躍遷並且產生了偶極矩的改變，造成官能基的震動。所以不同官能基的其釋放的能量不同，光的波長也會有所改變，因此獲得該物質的特徵光譜。本研究希望未來可以於臨床上添加一個快篩方法，於第一時間能增加醫生判斷的資訊以及投藥的準確性。另外透過搭配表面增強拉曼光譜的方式，利用表面共振的電漿原理，使分子指紋圖譜的訊號更佳的明顯，以達到更佳的辨識度。

1.2 臨床檢測方法及比較

目前在醫院中，由於細菌感染病患的傳統檢查方法須進行染色抹片和細菌培養，所耗費的時間冗長，目前臨床檢測方法有下列幾種：抗原抗體法、聚合酶連鎖反應、質譜儀和利用共聚焦顯微鏡觀察等。然而這些方法也並不是都適用於所有的檢體樣本，它們仍然有部分的使用限制存在。

- (1). **抗原抗體法**：利用抗原和抗體的專一性，加上酵素的呈色反應，來顯示特定的蛋白質是否存在，其特性有高度的專一性，但是其抗體並非皆是容易取得且並不能利用掃描的方式進行，多用於檢測細菌、黴菌、寄生蟲等。
- (2). **聚合酶連鎖反應(PCR)**：以分子生物學技術進行基因診斷法，使用酵素增幅特定之微量 DNA 或 RNA 序列之方法。然而手續過於繁複，需要專業的操作人員，並不適用於臨床的快篩制度。
- (3). **質譜儀**：質譜儀雖然是利用偵測分子量以達到可以有效的定性和定量物種的種類，由於儀器昂貴，加上需要專業人員操作，不適合用於臨床的快篩制度。

(4). 共聚焦顯微鏡：病原體較大時適用，如眼睛蠕蟲感染。病原體尺度需在 5 μm 左右較易診斷。

衍生問題

有礙於目前臨床檢測方法有著樣本量少、耗時、專一性不高等問題，加上大量濫用抗生素，而產生了抗藥性的問題，於是在此我們利用拉曼光譜，由於其高度的專一性、快速、便利、不需要特殊訓練過的專業人員、所需要的檢體數量也較少的特性，應能適合應用於臨床檢體之快篩機制，並且能於第一時間給予醫生一定比例的資訊，輔佐醫生進行判斷，以達到減小錯判的機會。

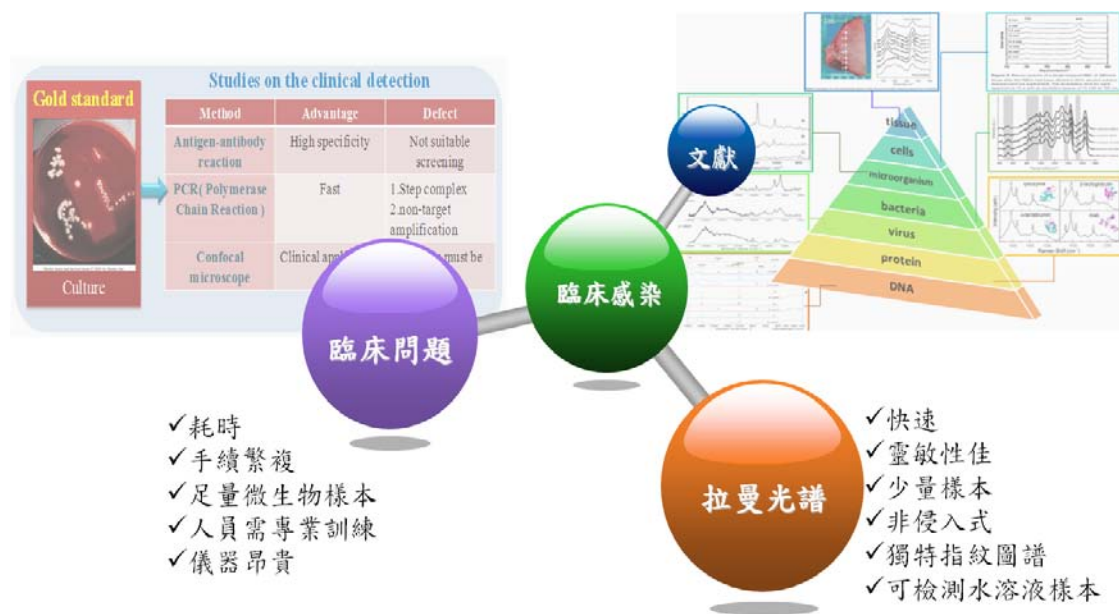


圖 1-1 研究背景與目的

1.3 文獻回顧

根據其前面的研究背景與目的，了解了目前抗藥性日趨嚴重的問題及臨床檢測的複雜性和其耗時的問題。所以，在此欲利用拉曼光譜的特性，嘗試對於高抗藥性的菌株進行拉曼光譜的檢測，本研究文獻回顧如圖 1-2 所示，將包括生物樣本拉曼光譜及SERS，首先將於此先介紹生物樣本：細菌(*Salmonella*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumonia*)及其各自噬菌體。之後將導入拉曼系統的介紹，及其所應用的各種研究，最後再帶入表面增顯拉曼效應，進行文獻回顧。

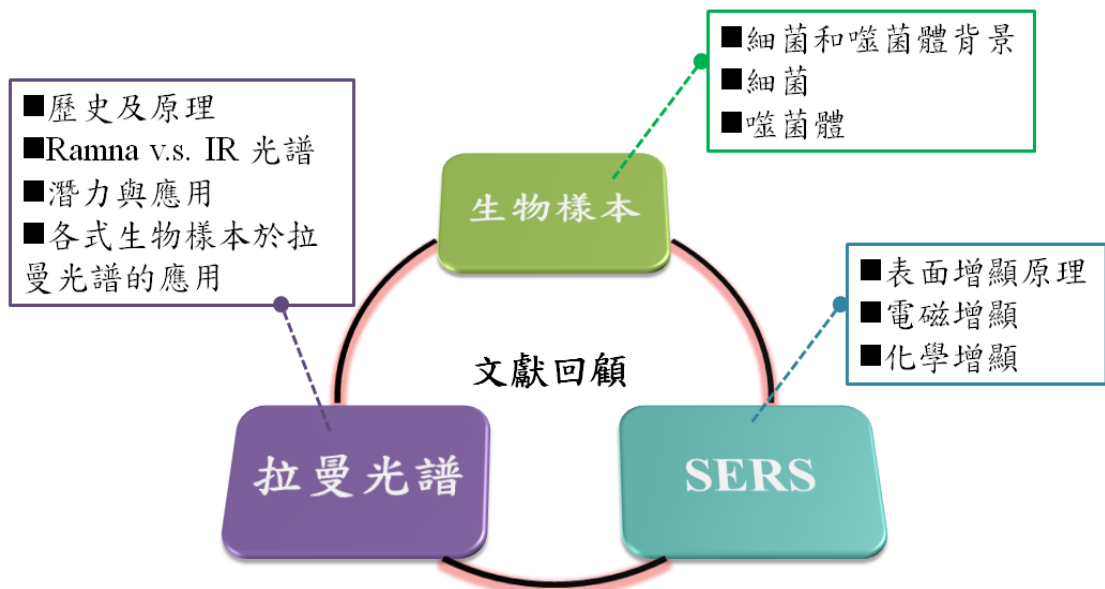


圖 1-2 文獻回顧脈絡圖

1.3.1 細菌背景介紹

細菌於環境中無所不在，細菌的主成成分大致有：脂質、蛋白質、核酸和碳水化合物等。儘管其細菌型態會有所不同，但主要的化學組成則幾乎類似。而細菌又可大致分為兩類：革蘭氏陰性菌與革蘭氏陽性菌。而這兩類皆有致病菌於其中。然由於現今抗生素的濫用，造成抗藥性問題嚴重。病理學家也發現，其革蘭氏陰性菌由於其細胞壁的成分含有內毒素層，會激發一種免疫反應，也由於其細胞壁構造，也使得細菌容易有抗藥性問題的產生，而菌種不同，其胞膜的組成成分也會不同；革蘭氏陽性菌則缺乏此內毒素成分，且細胞膜較薄。所以在此本研究聚焦於臨床抗藥性嚴重之細菌來進行檢測。

1.3.1.1 *Klebsiella spp.*

Klebsiella spp.[1]由德國病理學家Edwin Klebs所發現並命名，其為革蘭氏陰性兼厭氧型的細菌，形狀為桿狀。在分類上其域為細菌域(Bacteria)、變形菌門(Proteobacteria)、 γ -變形菌綱(Gammaproteobacteria)、腸桿菌目(Enterobacteriales)、腸桿菌科(Enterobacteriaceae)與克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*)，在哺乳動物的黏膜表面或自然環境中無所不在。*Klebsiella spp.*爾後被劃分為三種不同的種類，分別為Cowan，Bascomb和Ørskov，由於其DNA序列和感染疾病的分類，*Klebsiella spp.*最終被分類為：*K. terrigena*，*K. ornithinolytica*，*K. planticola*，*K. pneumoniae*，*K. oxytoca*，*K. terrigena*和*K. planticola*七個不同的種。*Klebsiella spp.*為一種伺機性的病原體，當人體免疫力下降時會造成嚴重感染或是併發症，如：肺炎、腦膜炎、敗血症、泌尿系統感染或傷口感染等。並於醫院加護病房中感染機率極高，若是治療不當，則死亡率極高[1]。

K. pneumoniae 之簡介

*K. pneumoniae*為革蘭氏陰性菌，屬厭氧型的腸桿菌科系菌，由德國病理與微生物學家Carl Friedländer(1847-1887)從肺炎病人身上分離，其*K. pneumoniae*為不具運動性的短桿狀桿菌，直徑為0.3~1.0 μm ，長度為0.6~60 μm ，為伺機性的病原體，當人體免疫力低弱時，會造成嚴重的感染，如：肺炎、腦膜炎、敗血症、泌尿系統感染或傷口感染等[2]。其 *K. pneumoniae* 的致病因子包括：

- (1). 莢膜 (capsular)：為一種多醣體，使細菌具有抵抗被人體吞噬的作用 (anti-phagocytosis) 和具有補體系統的功能。
- (2). 脂多醣體 (lipopolysaccharides)：與補體結合，可抑制補體作用。
- (3). 黏附因子(adhesin)：藉由纖毛(fimbriae)的頂端的黏附蛋白可以具有幫助病原體沾黏上宿主細胞的能力。
- (4). 螯鐵系統(siderophores)：病原體會和宿主體競爭鐵質並螯合鐵質，使宿主細胞因而失去鐵離子而死亡。

於1983年，發現病原體開始有 β -內醯胺酶 (extended-spectrum beta-lactamase, ESBL)的出現(BY review-1)，其產生的抗藥性問題也開始變成感染治療及監控之棘手問題。而台灣也不例外，從1999到2000年在某醫院也曾爆發院內感染的情形[3]，由於*K. pneumoniae*含有多種致病因子加上抗藥性基因的影響，也造成醫療上的難題。

1.3.1.2 *Acinetobacter* spp.

Acinetobacter spp.[4] 為變形菌門 (Proteobacteria)、 γ -變形菌綱 (Gammaproteobacteria)、假單胞菌目 (Pseudomonadales)、莫拉菌科 (Moraxellaceae)、不動桿菌屬 (*Acinetobacter*)。此種細菌為無移動性、葡萄糖非發酵性之革蘭氏好氧型球桿菌，於大部份的培養基和溫度下皆易培養，其普遍存在於自然環境中，亦為人類皮膚、腸胃道、黏膜、唾液中常見的正常菌株。然而 *Acinetobacter* spp. 亦為一種伺機性的病原體，當人體免疫力下降時會造成嚴重感染或是併發症，如：敗血症、支氣管炎、菌血症、肺炎等致死率極高的疾病[5]。

baumannii 之簡介

baumannii (鮑氏不動桿菌)，於1968年時被Paul Baumann發現*baumannii* 並且命名，俗稱為A. B.菌。為不具移動性的革蘭氏陰性耗氧型球桿菌，菌體無鞭毛和孢子，其病原菌寬度約0.9-1.6 μm 、長度1.5-2.5 μm ，具有莢膜，經常可以觀察到成對不一或長短不一的鏈狀。*baumannii* [6] 普遍存活在自然環境中，如：土壤、水、食物和下水道污水，喜好陰濕，為伺機性病原菌，生長條件簡單，利用大部份的培養基和培養條件皆可培養。生命力極強，可以存活於任何物體上，在人體中可存活於人類皮膚黏膜、咽喉呼吸道、腸胃道。*A. baumannii* 近年來引起嚴重的院內感染，通常引發敗血症、菌血症、支氣管炎或肺炎等致死率極高的感染。而目前*A. baumannii* 以極迅速的速度往抗藥性菌株發展，甚至至今已發展成全抗藥性的特性，1998年，台大醫院首度分離出對所有目前上市的抗生素[7]，均具抗藥性的鮑氏不動桿菌，即「全抗藥性鮑氏不動桿菌」(pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, PDRAB)，台灣於1998年前尚未有*A. baumannii* 的紀錄，然而到1999年時，於77名病患身上分離出199株全抗藥性的*A. baumannii*；於1999年到2000年時治療被PDRAB所感染的菌血症患者30名，其中18名死亡，其

死亡率高達六成。另外，由1998台灣微生物抗藥性監測計畫(Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance, TSAR)結果也表示，*A. baumannii*在更早之前的抗藥性就超過50%，且研究中也發現其對後線抗生素胺基糖苷類(amikacin)、第三代頭孢子菌素類(ceftazidime)的抗性為60%，而對氟化恩甯類(ciprofloxacin)的抗性已達約70%。另外，原本對imipenem在1998年以前還維持僅有2%的抗藥率，但至2004年時已高達16%，*A. baumannii*嚴重抗藥性問題，造成了治療上極大的瓶頸。

1.3.1.3 *Salmonella* spp.

Salmonella spp.於1880年首度被德國細菌學家Karl Joseph Eberth發現，後由美國一位獸醫病理學家Daniel Elmer Salmon命名，其為革蘭氏陰性菌，形狀為桿狀，被分類為細菌域(Bacteria)、變形菌門(Proteobacteria)、 γ -變形菌綱(Gammaproteobacteria)、腸桿菌目(Enterobacteriales)、腸桿菌科(Enterobacteriaceae)和沙門菌屬(*Salmonella*)。*Salmonella*廣泛分布於環境中，也常出現於農場的動物排泄物中或存在於受到排泄物污染的環境中[8]，其感染普遍發生於密集飼養動物的地方。其感染的動物，以懷孕和幼齡動物更易受到感染。在臨床上，若是受到感染，會產生腸道症狀、敗血症、流產或是呼吸道症狀等，然而許多動物在感染時徵狀並不會太明顯，但此類的潛伏期感染也有可能是造成人類食物中毒的來源。*Salmonella*為革蘭氏陰性菌，形狀為桿狀，菌體四周有多條鞭毛，無孢子，其寬度約為0.5-1.0 μm ，長度為1.0-6.0 μm 。由於此種病原體能夠於腸壁間白血球的攻擊之下[9]，還能繼續生存且增長，此種疾病幾乎可以感染各種家畜，文獻中也指出活體豬隻所含有的病原體約為屍體的3~4倍，而被屠宰的豬隻所攜帶的病原菌有70%是本身是帶原者，而30%為交叉感染所得。當家畜類受到病原體感染共分為三個階段：(1)細菌會在腸壁上繁殖。(2)開始入侵腸道。(3)並感染至腸膜、淋巴結或其他器官。對於畜牧業而言，此種病原體感染是存

在的大問題，必須嚴格並且謹慎的使用抗生素，並且在屠宰和運輸作業上也需要更加嚴格把關。然而因抗生素的使用，造成抗藥性的問題開始產生。

1.3.2 噬菌體簡介

1.3.2.1 噬菌體歷史與簡介

於 1896 年時生物學家 Ernest Hankin 於印度恆河及贊木納河水中發現一種具有抗菌效果的物質。而後於 1915 年時，Frederick 由微球菌 (Micrococci) 中分離出噬菌體。之後於 1917 年由 d'Hrelle 在瘧疾桿菌 (Dysetenry Bacillus) 的培養皿中也發現有 Clear Zone，並將其命名為噬菌體 (Bacteriophage)，此名字是由「細菌」(Bacteria) 和「吞噬」(Phagein) 兩字所組合而成，由字面上的意思可知，是一種以細菌為宿主的微生物[10-11]。

噬菌體是以細菌為宿主的病毒，具有高度的專一性，普遍存在於環境中。而噬菌體又可分為兩類：溶裂型(Lytic)和潛溶型(Lysogeny)，如圖 1-3 [10-12]。

溶裂型:噬菌體會先附著在細菌的細胞膜上，並將 DNA 注入細菌中，並在宿主細胞內進行其 DNA 的合成和分化，於細胞內組裝噬菌體，並於成熟後由宿主細菌的細胞內裂解細菌，釋放出噬菌體。

潛溶型:噬菌體則是附著於宿主細菌後，將其 DNA 注入細菌中，在此時可能會有兩種變化，其一則和溶裂型噬菌體的行為一樣；另一則會將其 DNA 整合進入宿主細菌的染色體中(Lysogenization)，隨著宿主一樣複製著自身的遺傳物質，之後再等待適當的時機由細菌中釋出。

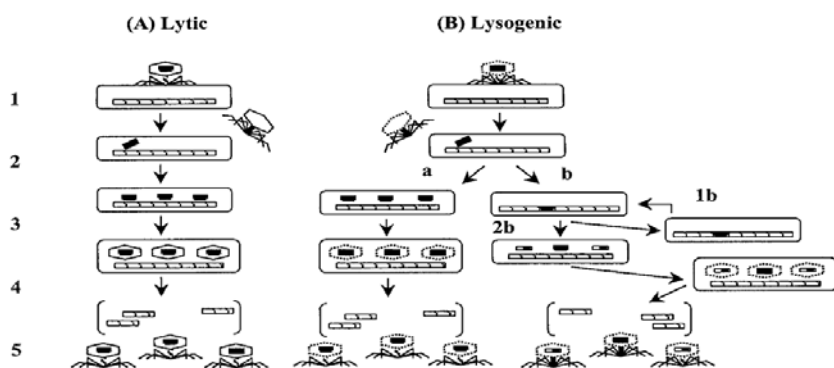


圖 1-3 噬菌體之複製行為：(A)溶裂型(B)潛溶型

1.3.2.2 噬菌體的應用

噬菌體對人體進行治療[10-11, 13-14]：

- 1919年D'Hrelle利用噬菌體於一位12歲孩童身上進行抗痢疾的治療，後來病情並無繼續惡化，並且於數日後便恢復健康。
- 1932年D'Hrelle受邀至印度解決霍亂問題，利用溶裂型的專一性噬菌體進行治療，結果也使得病情有顯著的改善，使死亡率明顯下降。
- 1928年，弗萊明發明了抗生素Penicillin，並且由於1942年二次大戰的催生，使得抗生素開始量產與應用。爾後，由於抗生素的廣效性和作用快速，便開始被廣泛使用，而噬菌體這種治療方式便逐漸被取代。
- 1980年，學者將噬菌體和抗生素結合，應用於治療*Staphylococcus*、*Streptococcus*、*E. coli*、*Proteus*等所造成的肺部感染，成功治療了45名患者。
- 1983~1987年，學者利用噬菌體治療*Staphylococcus*、*Pseudomonas*、*E. coli*、*Klebsiella*、and *Salmonella*所引起的身體各部位感染，共550個病例，其治療之成功率高達92%。
- 1987年，學者利用口服和局部的噬菌體治療，成功治療了慢性感染的皮膚潰瘍，成功率達74%。
- 1994年，學者成功的利用*E. coli*噬菌體對於產生抗藥性的*E. coli*治療。
- 1991年，學者分別用抗生素、噬菌體、抗生素與噬菌體的結合三種組合治療*Staphylococcus*、*Streptococcus*、*E. coli*、*Proteus*、*enterococci*、and *P. aeruginosa*，共1380為病患進行治療比較，其成功治癒的機率分別為48%、86%和83%，其可明顯比較出利用噬菌體和抗生素與噬菌體結合治療的成功率遠高於抗生素的成功率。

噬菌體對動物類應用：

Huff等人進行一系列的實驗，證實利用*E. coli*噬菌體於噴霧中或是應用於注射中皆有其預防與治療的功效[15]。另外，空腸桿菌是感染家禽的主要病原體，並且經由研究發現，將噬菌體應用於豬隻或是家禽上，可以減少病原菌對其的感染。在水產養殖方面也證實利用噬菌體於魚類的人工養殖環境，可以用來預防*Lactococcus garviae* 或 *Pseudomonas plecoglossicida* 對魚類所造成的感染。

1.3.2.3 應用噬菌體治療之優點

應用噬菌體治有以下幾個優點[10]：

- (1). 噬菌體的專一性高且非藥物，可使用於對藥物敏感的患者，目前文獻中尚未發現有副作用問題產生；抗生素則不然，抗生素可能會同時針對致病微生物和正常菌落進行殺害，如此一來則會造成生物體內失衡，甚至可能會有副作用或病原體繼續增長的問題。
- (2). 噬菌體可在感染處直接增長，並非像抗生素需要經由生物體內的代謝，經過代謝作用後可能會造成抗生素不一定會集中在患部的現象，利用噬菌體直接於患部的生長，可以更有效的達到治療效果。
- (3). 細菌對於噬菌體的抵抗能力仍屬易受感染型，甚至不同的噬菌體可能有相似範圍的宿主對象。抗生素對細菌的抵抗能力有限，也不像噬菌體範圍廣泛，產生細菌對其產生抗藥性的機會較大。
- (4). 篩選新的噬菌體僅需在幾天內則可完成；開發新的抗生素則費時耗人力，可能需要數年時間。根據物競天擇，噬菌體也可能會隨著抗藥性病原體或抗噬菌體病原體進行持續不斷的演化。
- (5). 噬菌體僅有在宿主還存活時才會進行複製和繁衍，在無宿主的狀態下，則不會進行一切生物活動行為，因此利於保存。
- (6). 噬菌體會隨著宿主細胞感染，若是宿主細胞深入皮下組織感染，噬菌體亦會隨之深入組織並消滅宿主。

1.3.3 拉曼光譜的介紹與原理

1.3.3.1 拉曼光譜的歷史

1928 年印度科學家 C. V. Raman 於利用實驗證明了光與物質的作用，也就是所謂的散射光。其大部分的入射光波長會和散射光相同，但仍有少部分的散射光會產生位移的現象，而這種位移現象，也就是所謂的拉曼散射。一開始拉曼散射並不廣為使用，其原因為能量微弱，並不利於觀察。然而至 60 年代後，隨著雷射的發明和光學科技的進步，才使得拉曼散射較為被廣泛使用。拉曼散射一開始主要以分析物質的結構為主，透過官能基的震動模式了解物質的分子結構並進行分析，後來由於多種雷射波段的發明和光譜演算技術的進步，使得拉曼光譜開始延伸運用於生物醫學等領域，目前儼然已成為的重要分析工具之一。於 1974 年時 Fleischmann 於實驗室中發現可以增強拉曼光譜訊號的方法，也就是所謂表面增強拉曼散射 (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, SERS)，其利用吡啶(Pyrimidine)於銀電極表面檢測到非常強的拉曼光譜，這也使得許多學者投入 SERS 基材的研究與開發，造就拉曼光譜可以更加廣泛的應用於各個領域中[16]。

1.3.3.2 拉曼光譜的原理

拉曼光譜是利用物質分子經由光的照射後，透過晶格或是官能基的振動、轉動模式來研究待測分子。如圖 1-4 所示，拉曼光譜的原理為當一到入射光射入一個物質時會產生吸收、穿透、反射、散射等現象，而拉曼光譜就是利用其散射的原理。散射光又分為兩種，一種為彈性散射，另一種為非彈性散射。所謂的彈性散射，就是當光照射此物質時，由於電子受到光能量的激發，使得電子由基態躍遷到激發態，再由激發態回到基態，此一過程並沒有產生能量的散失，此為散射光又稱為雷利散射(Rayleigh Scatter)。相反地，當入射光照射一物質，其電子受到光的激發造成電子躍

遷，然散射光波長不再等於入射光波長，產生了能量差，也就是拉曼散射(Raman Scatter)。相較於雷利散射(Rayleigh Scatter)而言，Stokes 拉曼散射(Stokes Raman Scatter)的能量則較低。當入射光照射於物質時，光子會和物質發生作用，而此激發光會造成物質分子極化，使得電子由基態躍遷至虛態(Virtual State)，而電子會再由虛態能階回到比原能基更高層的能階，並且釋放出光子，此光則稱為散射光，也就是所謂的 Stokes 拉曼散射(Stokes Raman Scatter)。相反的，Anti-stokes 拉曼散射(Anti-stokes Raman Scatter)則是物質分子一開始處於激發狀態，受到入射光產生分子振動能而產生散射光的能量，使得電子躍遷至虛態，再由虛態能階回到基態而產生 Anti-stokes 拉曼散射(Anti-stokes Raman Scatter)，此情形發生的機率較 Stokes 拉曼散射(Stokes Raman Scatter)小，但其散射光的能量相較於瑞利散射(Rayleigh Scatter)也較大。所以相較於瑞利散射(Rayleigh Scatter)，Stokes 拉曼散射(Stokes Raman Scatter)和 Anti-stokes 拉曼散射(Anti-stokes Raman Scatter)是處於對稱的情形[16-17]。

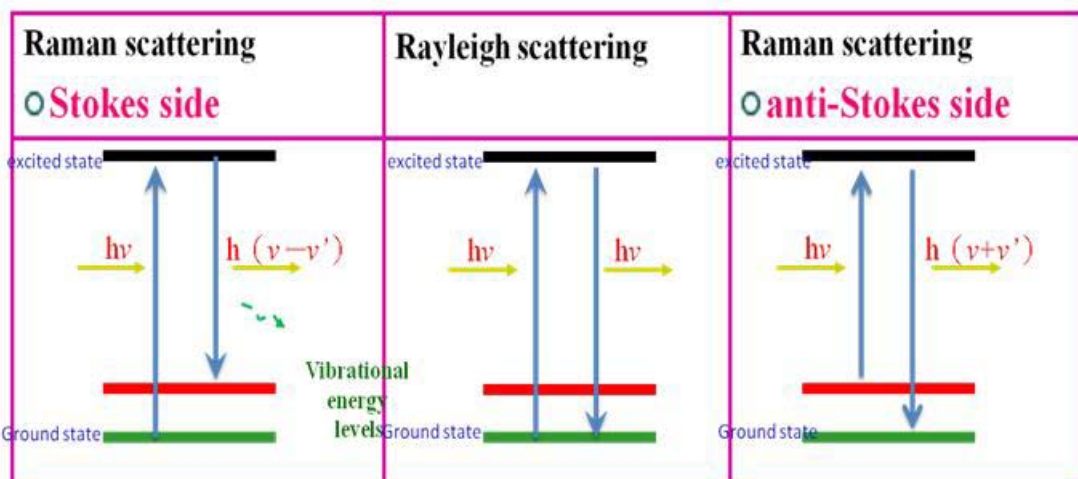


圖 1-4 拉曼系統能量躍遷圖

1.3.3.3 紅外線光譜儀與拉曼光譜的比較

紅外線光譜儀(Infrared absorption spectroscopy)與拉曼光譜皆是運用其官能基振動的原理，當一道光入射照到樣品時，會同時伴隨著吸收和散射現象之物理現象。對紅外線光譜儀和拉曼光譜而言，雖光譜原理雖相同，但在光的原理上卻完全不同。由圖 1-5 紅外線光譜和拉曼光譜的能量躍遷圖，在吸收能量的過程中會發生其入射光的能量會和其基態和虛態之間的能階差相等，而物質分子吸收入射光的能量而使原本基態能量躍遷到激發態。由於外紅外光($4000-14000\text{ cm}^{-1}$)並非諧波(overtone)，所以大多數的生化上的研究，通常集中在中紅外光部分($600-4000\text{ cm}^{-1}$)，此處包含了許多豐富的資訊。其紅外線吸收光譜是透過其吸收現象的偶極矩變化，拉曼光譜則是透過分子間極化率的變化。當分子在振動時，會使其電子雲產生改變，而這也將造成偶極矩和極化率的變化。以圖 1-6 CO_2 分子之振動模式中的 CO_2 原子分子為例(圖 1-6)，其對稱伸縮會引起強烈的極化率變化，因此將會有強拉曼效應。而此時亦將有微弱或沒有偶極矩效應，就是只有微弱或沒有極化率效應。形變模式(移動或轉動)則引起偶極矩變化，其極化率幾乎不變，所以會有強紅外光吸收，微弱或沒有拉曼效應。單就強度上而言，紅外線光譜的吸收光相較和拉曼光譜的散射光較強，對於較強硬的官能基振動模式較能激發其能量，但相較官能基振動模式較微弱生物分子，則使用拉曼光譜其訊號較為明顯。由圖 1-7 所示，將拉曼光譜和紅外線光譜同時對血漿檢測，在 $1240-1300\text{ cm}^{-1}$ 處皆有明顯的 amide III 的特徵峰，在 1005 cm^{-1} 處的苯丙胺酸官能基振動，於 IR 光譜上並不明顯，但於拉曼光譜上則明顯的多[18]。

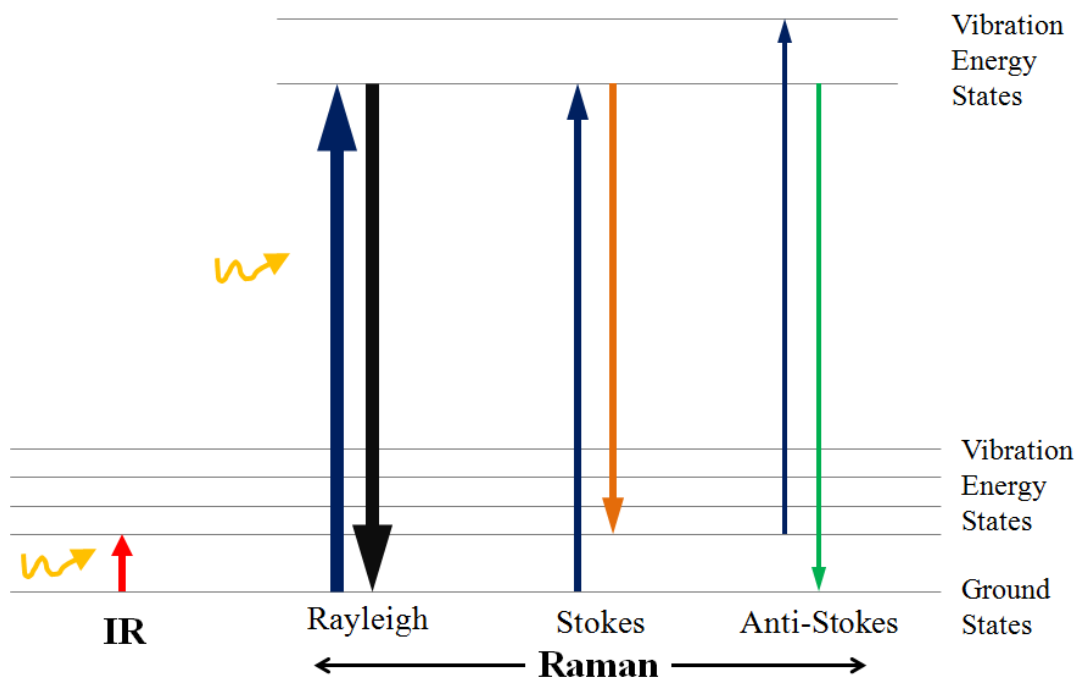


圖 1-5 紅外線光譜和拉曼光譜的能量躍遷圖[18]

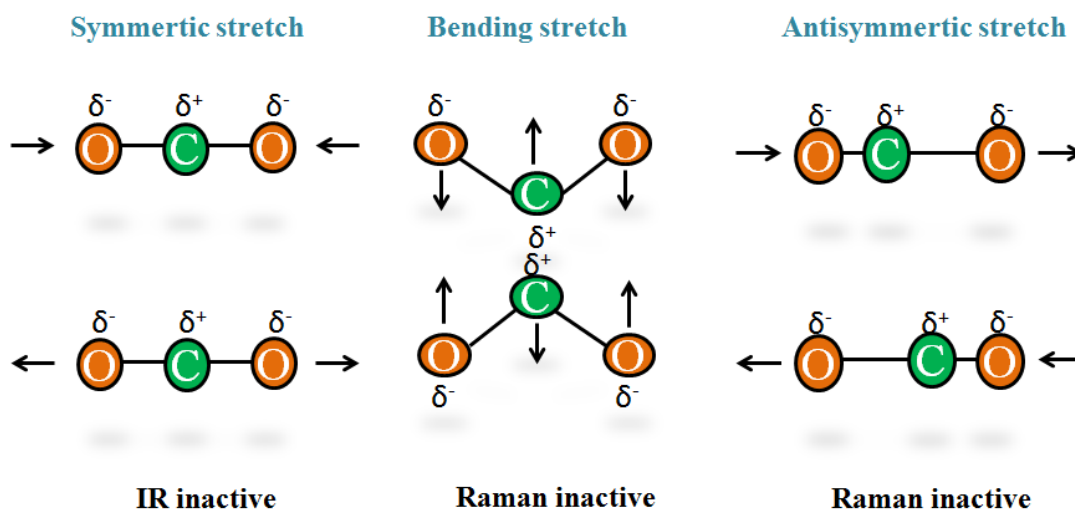


圖 1-6 CO₂ 分子之振動模式[18]

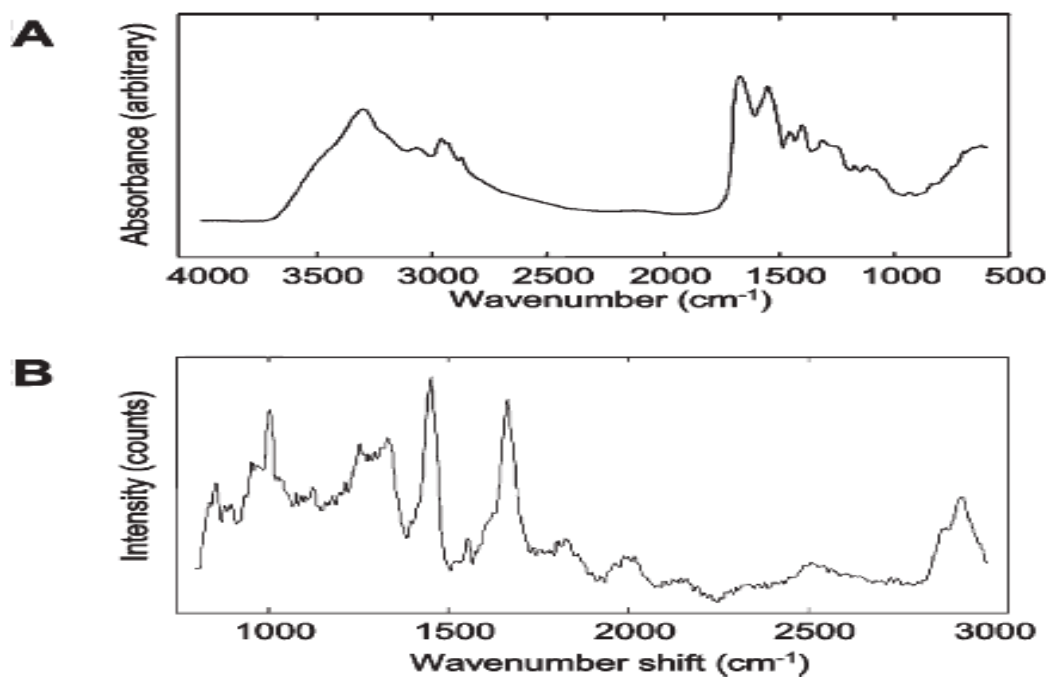


圖 1-7 (A)紅外線光譜(B)拉曼光譜的指紋圖譜。

對於能否偵測水溶液樣本，也是這兩套儀器系統的大差別，紅外線光譜對水的吸收訊號非常強烈，於是所得的圖譜會被水分干擾，使待測物之訊號不易分析。但拉曼光譜可以含有水溶液的樣本，這樣也減少了其前處理動作和時間。因拉曼光譜快速、高專一性、非侵入式和可檢測水溶液樣本的特性，目前也被應用於許多層面。

1.3.3.4 拉曼光譜的潛力與應用

拉曼光譜利用化學鍵和官能基振動模式，及快速、靈敏性高、僅需微量樣本、再現性佳、能測量含水樣本和非破壞性的特性，在現今其應用非常廣泛，例如：生物醫學、環境檢測、材料分析、鑑識科學、製藥、食品或歷史文物鑑定等[19]。

1.3.4 拉曼光譜於生醫領域的應用

拉曼光譜利用樣品官能基振動所得獨特指紋圖譜進行分析，其特色為以非侵入性和非破壞性的方法檢測，加上具有快速、微量、靈敏度強、可檢測含水成分樣品等優點，透過檢測核酸、碳水化合物、蛋白質和脂質的結構和組成成分的改變，可以應用於：組織、細胞、蛋白質和 DNA 的檢測，在微生物的檢測亦如此，如：酵母菌、細菌、病毒、噬菌體等。由於本研究主要針對細菌與病毒的圖譜分析，所以在文獻比例上，也會佔較重之比例[18, 20]。

拉曼光譜對於組織的檢測

在臨床疾病的診斷中，很多疾病的診斷方式是需要進行侵入式的診斷，例如：病理切片。然而目前臨床上也漸漸發展出非侵入式的成像診斷方式，像是 X 光、超音波和核磁共振等，然而卻也不一定能做出決定性的疾病診斷，因為其只能給予病灶一定的大小、位置或形狀。然而大多數的疾病伴隨著細胞中的生化分子組成的改變，可更精確的診斷疾病，利用拉曼光譜採非侵入式的檢測方式，近年來應用於許多部位的癌症的檢測或是體液的檢測，例如：乳癌[21-22]、皮膚癌[23]、胃癌[24-25]或肺癌[26]等檢測。1995 年時， McCreey 等人利用拉曼光譜於乳房的良性纖維瘤和惡性腫瘤上進行區別[21]，透過不同膠原蛋白的波峰強度和脂質的分析，區分良性和惡性腫瘤。在皮膚的檢測上，2003 年時， Puppels 等人結合顯微鏡和拉曼光譜系統等技術，以非侵入式的方式對皮膚進行檢測[23]，利用拉曼光譜針對汗腺和皮脂腺進行檢測以測得皮膚角質層中的水分和保濕因子的濃度，並於汗腺的拉曼圖譜中發現乳酸、尿素和主要保濕因子的成分在其中，而皮脂腺圖譜則發現含有脂質的訊號在其中。以 2005 年 Min 等人的研究為例，由圖 1-8 將肺部進行拉曼光譜的檢測[26]，發現正常組織圖譜和癌症

組織圖譜差異甚大，而此圖譜於 $1500\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ 的範圍會有所改變。

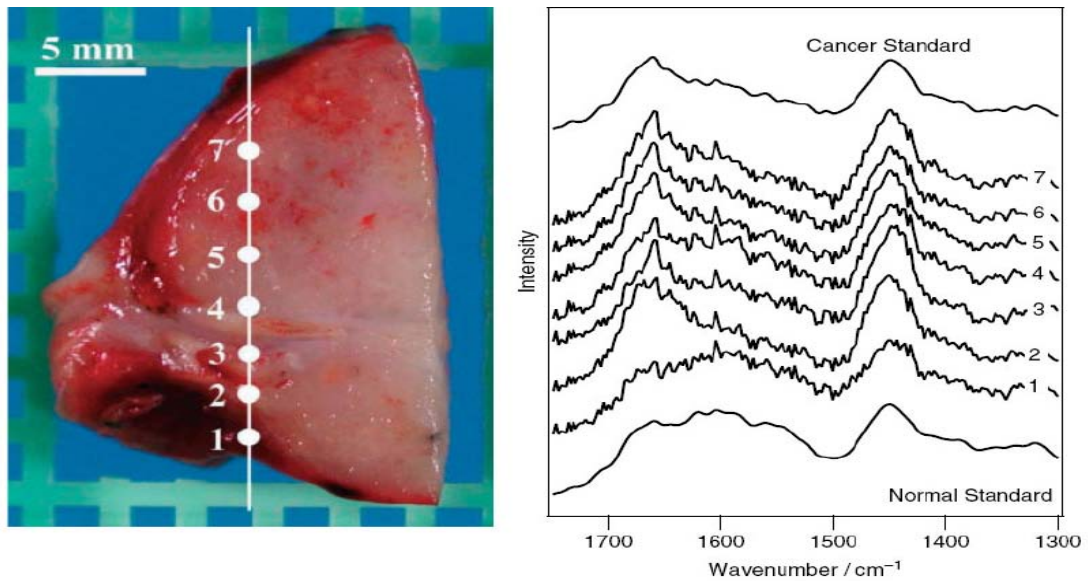


圖 1-8 肺組織切片的拉曼圖譜與其所檢測的位置[26]

2010 年時，Zheng 等人利用拉曼光譜對胃部進行檢測[24]，由於傳統的胃部內視鏡對於較不明顯的組織變化，較難以分辨，於是期望利用拉曼光譜的非侵入性直接對於可疑病灶進行檢測，得到其生化相關的資訊。由於擴散型腺癌症常會伴隨的間質的增生，造成膠原蛋白的含量增加，因此透過比對正常人和癌症病患的拉曼圖譜可以觀察到其膠原蛋白的訊號增強(875 cm^{-1})而蛋白質和脂質的振動特徵峰(1450 cm^{-1})，也有強度增加的趨勢。

拉曼光譜對細胞的檢測

拉曼光譜亦可利用於檢測活細胞，而其指紋圖譜所提供的資訊，主要是透過四大重點進行分析：核酸、碳水化合物、蛋白質和脂質，利用此四種生物分子的結構和變化，並且使用相對含量的生化成分比例，和量化光譜的振動帶，可了解細胞的差異，而這些差異也會因為細胞的增殖，會有些生化比例的改變[27]。也由於拉曼光譜的侵入式特性，對於許多的生理過程：傷口復原、免疫反應、癌化現象等。皆可以透過細胞組成的改變，都可利用拉曼光進行檢測。

1990 年時，Puppels 等人利用共聚焦顯微拉曼光譜單個活細胞和其染色體的指紋圖譜[16]。於 2005 年時，Short 等人則針對培養中的哺乳類細胞檢測其生長和增殖，配合相對的生化比例(當細胞增殖時，其脂質變少，蛋白質和 RNA 的量增加)所顯現的圖譜，以達到細胞的增殖變化觀測[27]。2004 年時 Farmer 等人利用拉曼光譜區分正常、膀胱炎和膀胱癌，再利用統計分析進行分類，期望用其作為疾病的分期機制[28]。Chan 於 2006 年時，利用拉曼光譜對正常的淋巴細胞和癌化的淋巴細胞檢測，透過其指紋圖譜分析 DNA 和蛋白質的含量反應在其官能基特徵峰的強弱，對此兩者進行劃分[29]。

拉曼光譜對微生物的檢測

由於臨床上為了細菌培養需耗費較長的時間，在2000年時， Puppels 團隊就利用培養六個小時的固態培養基上的細菌直接利用拉曼光譜進行檢測[30]，並且於一天內即可得到病人檢體的結果。除此之外，亦可用拉曼光譜對其微生物的生長週期進行檢測[31-32]，於2005的Huang等人利用其拉曼光譜對酵母菌的生長週期進行檢測[33]，透過不同的生長周期時的酵母菌之生化結構改變，可得到不同的拉曼指紋圖譜。2003年， Esposito 等人利用拉曼光譜檢測同屬的芽苞桿菌所得光譜[34]，透過苯丙胺酸的振動模式和calcium dipicolinate (CaDPA)強烈振動模式進行討論。而J. Popp等人則是將藤黃微球菌(*Micrococcus luteus*)、枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)和螢光單胞菌(*P. fluorescens*)利用拉曼光譜進行指紋圖譜比對[34]。將此細菌直接培養於培養基上，選用785 nm雷射，收集時間為90秒或120秒直接進行檢測。結果如圖 1-9，不同菌種所得的拉曼圖譜也不盡相同，此結果表示拉曼光譜是有鑑別不同菌種能力。

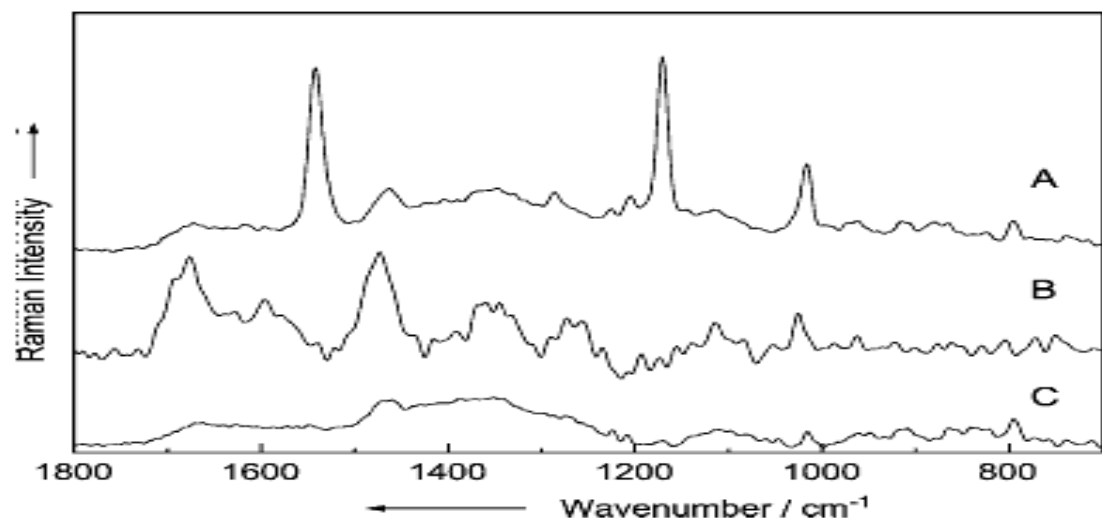


圖 1-9 不同菌株之拉曼光譜：(A)藤黃微球菌(*Micrococcus luteus*)；(B) 枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)；(C)螢光單胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) [34]。

2009年時，Popp團隊再度利用拉曼光譜直接分析易感染細菌性腦膜炎的細菌細胞[35]，選用532 nm雷射，收集時間為30-60 秒，其生物樣本分別為：李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、腦膜炎球菌(*Neisseria meningitides*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、無乳鏈球菌(*Streptococcus agalactiae*)和肺炎鏈球菌(*S. pneumoniae*)。結果如圖 1- 10，儘管圖譜僅有些微差異，但配合統計分析方法-聚落分析(hierarchical cluster analysis；HCA)做最後的結果分析，依然能達到鑑別不同細菌的效果。

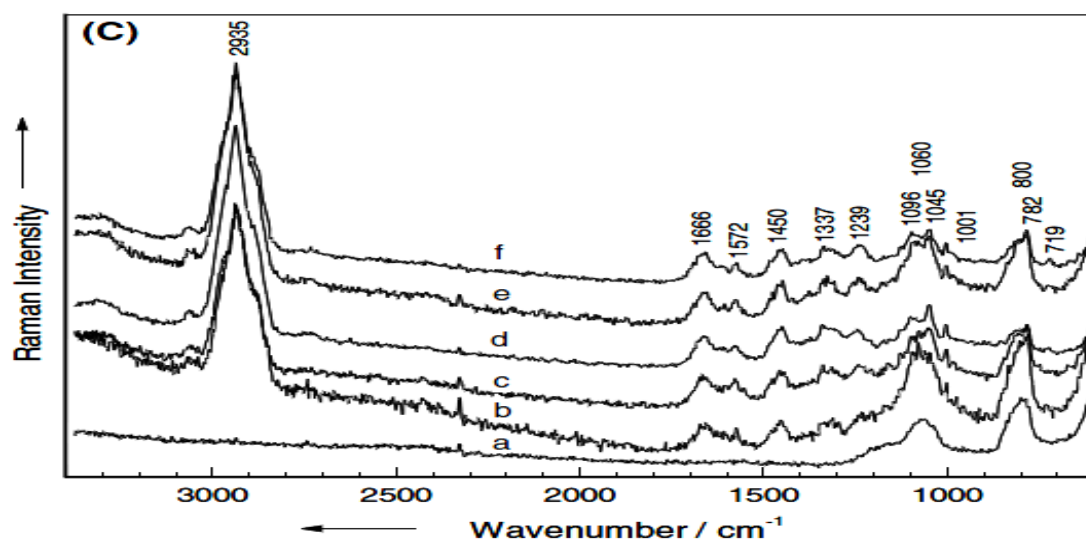


圖 1- 10 拉曼圖譜之不同菌株比較：(a)基材；(b)李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)；(c)腦膜炎球菌(*Neisseria meningitides*)；(d)表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)；(e)無乳鏈球菌(*Streptococcus agalactiae*)；(f)肺炎鏈球菌(*S. pneumoniae*) [35]

拉曼光譜對於不同種細菌的鑑別

由文獻指出，利用拉曼光譜可以鑑別同一種類但不同基因的變異細菌，而這些細菌通常為醫院內的致病菌。許多文獻對於同屬不同種的菌株進行檢測，其中包含念珠菌種(*Candida* Species)[36]、結核分枝桿菌種(*Mycobacteria* strains)[37]和葡萄球菌種(*Staphylococcus* genus)[38]等。於2005年時Popp等人利用拉曼光譜針對同屬金黃色葡萄球菌但不同菌株進行檢測[38]，利用其生化組成的不同進行分析。此外，Buijtelts團隊於2006年利用拉曼光譜對*Acinetobacter* strains進行檢測[39]，此團隊由3個城市5間醫院所收集到的爆發菌株共25株，並選用拉曼條件為830 nm，收集時間為30秒的條件進行檢測，並以5次圖譜結果進行平均，結果如圖1-11，利用拉曼光譜檢測不同種的*Acinetobacter* strains，透過其平均圖譜顯現出的灰色區域也表示出其各菌株間的不同特性，之後再利用統計分析方法進行分析。其拉曼光譜在菌株的分類上確實可以利用其指紋圖譜鑑別不同的菌株，未來若能使用於臨床上，將能輔助醫生於初診時判斷和治療，提供參考的依據。

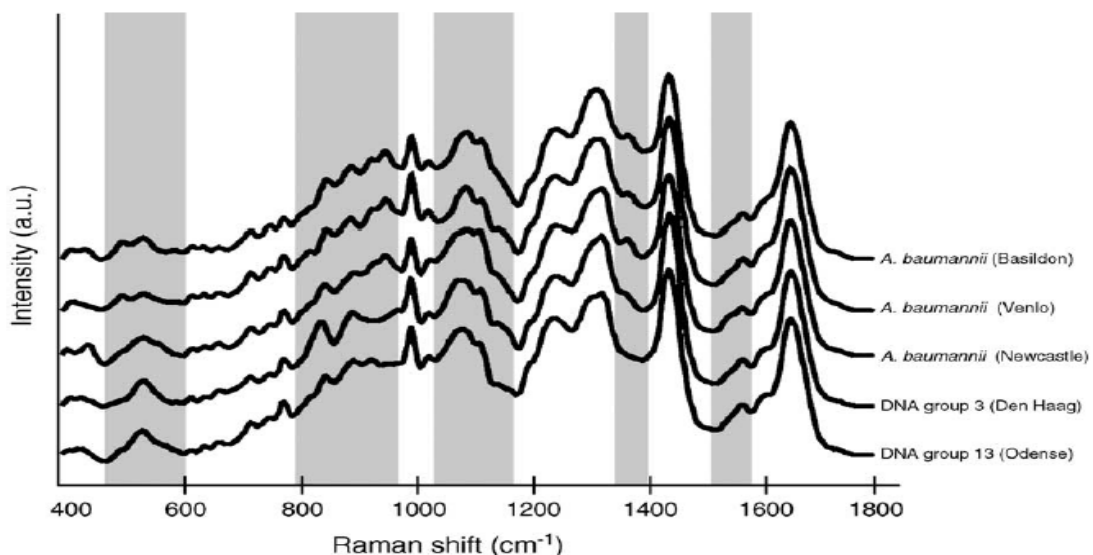


圖 1-11 各爆發 *Acinetobacter* strains 菌株的平均圖譜。
比較灰色區域可發現其各菌株間的不同特性。

拉曼光譜對病毒的檢測

有鑒於目前臨床上用於檢測病毒的方式已有多種，但目前檢測方式：ELISA、螢光抗體檢測、血清檢測等缺乏靈敏性，而PCR則是步驟繁瑣，若是使用原子力顯微鏡則無法清楚區分病毒種類，於是利用拉曼光譜具有快速以及再現性佳的特性進行病毒檢測[40-41]。2006年，Tripp等人利用拉曼光譜結合表面增顯效應(SERS)分別對不同的病毒進行檢測，為了得到更佳的病毒指紋圖譜，也利用了拉曼增顯基材，其基材利用直徑 $99\text{ nm}\pm 95\text{ nm}$ 的銀奈米棒進行濺鍍和蒸鍍，使得銀奈米棒沉積的角度和正常基材的角度呈現 86° 角，並且搭配 785 nm 雷射，累積時間為30-50秒分別對鼻病毒(rhinovirus)、腺病毒(adenovirus)、人類免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus)和不同的流感菌株(influenza virus strains)檢測，並且具有鑑別的功能(圖 1-12) [42]。

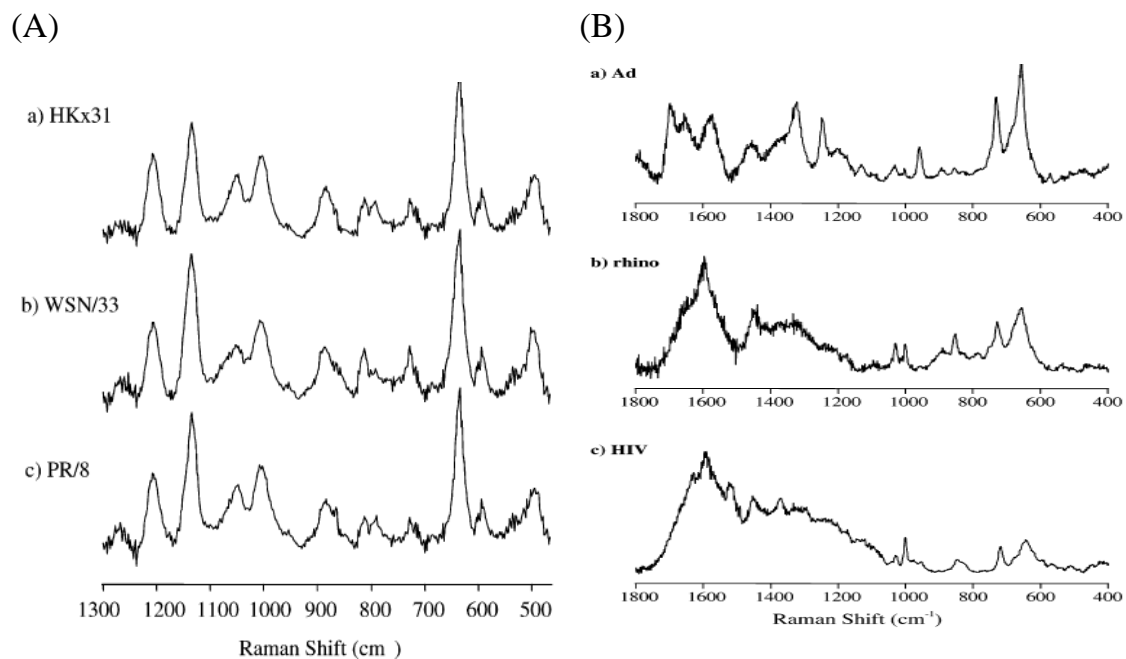


圖 1-12 不同種類的流感菌株拉曼圖譜：(A)SERS 效應下不同流感菌株(B) SERS 效應下的 Ad、Rhino 和 HIV 拉曼圖譜 [42]

此外，於2007年時Riley等人也利用拉曼光譜結合表面增顯效應對同屬病毒類的噬菌體檢測[40]，其使用的噬菌體為25 nm的RNA病毒型噬菌體MS2，其宿主為大腸桿菌(*E. coli*)和75 nm DNA病毒型含有脂質的噬菌體，可感染沙門氏菌(*Salmonella*)和大腸桿菌(*E. coli*)的噬菌體PRD1。將這兩株噬菌體和共同宿主*E. coli*作指紋圖譜的比對(圖 1-13)。

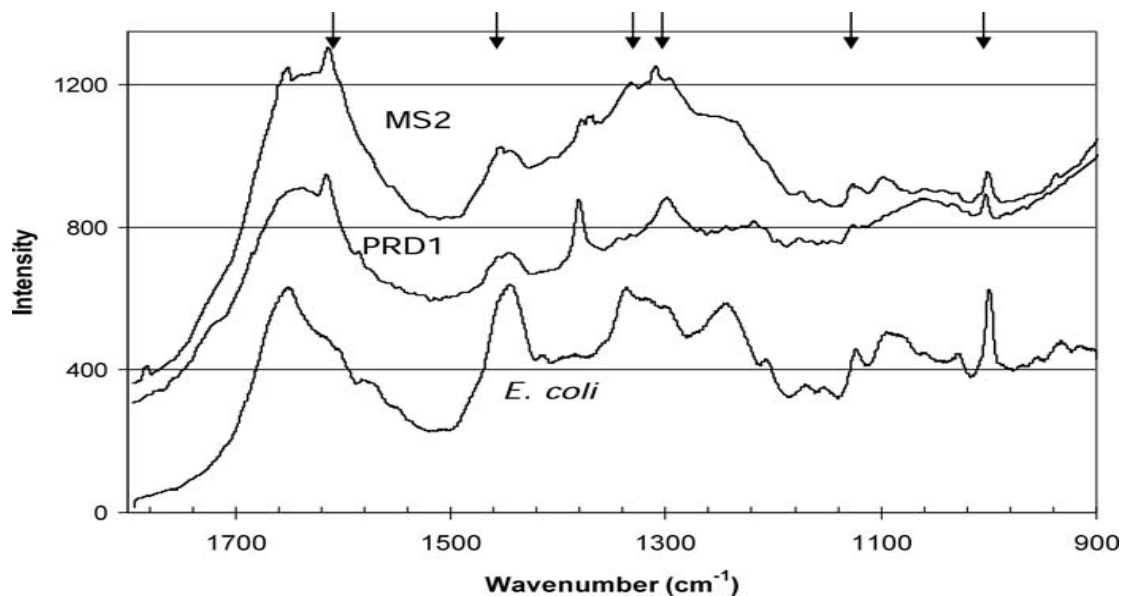


圖 1-13 噬菌體與其宿主細菌之指紋圖譜：MS2(10^{12} pfu/mL)、PRD1(10^{12} pfu/mL)和 *E. coli*(10^8 cells/mL)[40]。

由結果發現，由於PRD1較MS2尺寸大，其內部所含的脂質較多，因此圖譜於 1301 cm^{-1} 處脂類官能基振動處，PRD1的特徵峰也較MS2大的多。此外，於 1620 、 1380 和 1301 cm^{-1} 的特徵峰比較則可定義為區分細菌和噬菌體的依據。此一概念可用於本研究上，利用拉曼圖譜或搭配表面增顯效應並結合統計分析，進行不同細菌和病毒的鑑別，以期待可以明顯區分細菌和噬菌體的差異。

拉曼光譜對於蛋白質的檢測

誠如前面所提，拉曼光譜是利用分子官能基的振動模式轉換成指紋圖譜，以提供整個分子的組成和結構的資訊。而對於蛋白質的檢測亦為如此，應用拉曼光譜檢測蛋白質已實行約三十年以上，由蛋白質的指紋光譜不僅能夠得到有關的芳香族組成的胺基酸資訊，亦可利用蛋白質的多肽骨幹產生的振動模式來測定蛋白質的二級結構，除了可了解主鏈的構像，像是 amide I 和 amide III 的振動模式(螺旋、折疊、回折或是無規捲曲)或 C-C 和 C-N 的官能基伸縮振動，甚至側鏈結構[43-45]，例如：酪胺酸的對羥苯基環、色胺酸的吲哚環、苯丙胺酸的單基取代苯基環、S-S、C-S 和 -SH 皆可利用光譜所得到的強度比例，計算二維結構和三維結構[43]。所以當拉曼光譜應用於生物檢測時，對於細菌或是病毒的檢測，就可提供膜蛋白或外殼蛋白的訊息以利分析。此特色，亦使拉曼光譜被應用於生物分子的技術應用，藥物生產和食品行業中。

拉曼光譜對 **DNA** 的檢測

DNA 是生物體中重要的遺傳物質，當 DNA 結構變化時，導致細胞或是細菌狀態也會跟著改變。許多研究指出，利用拉曼光譜對於核酸進行檢測[44, 46-49]，透過指紋圖譜的變化給予此生物體立即訊息。由文獻中提及，小牛胸腺 DNA 會由於濕度的不同造成產生三種結構[50]，在相對濕度為 75% 時是 A 型 DNA，鹼基和水平面會呈現 20 度角，所對照的光譜位置為 807 cm^{-1} ；其相對濕度為 98% 是 B 型 DNA 的夾角為 0 度角，所對照的位置為 835 cm^{-1} ；而相對濕度 47% 時是 Z 型 DNA 所呈現的夾角為 6 度角，其所對照位置為 $865\sim 870\text{ cm}^{-1}$ 。



圖 1-14 小牛胸腺的拉曼圖譜[50]

由於拉曼光譜的快速、靈敏、高專一性、非侵入性和能夠檢測水溶液

樣本的特性，使得其應用範圍極其廣泛，透過圖 1- 15 可明確總結拉曼光譜可檢測的生物分子的層級和目前臨床檢測方法的分子層級和難易程度。然而也因散射光的強度較弱，造成圖譜訊號較弱或是不明顯，所以許多學者也試著利用奈米粒子結合拉曼光譜，希望圖譜能達到增顯效應，使得訊號更加明確清楚。

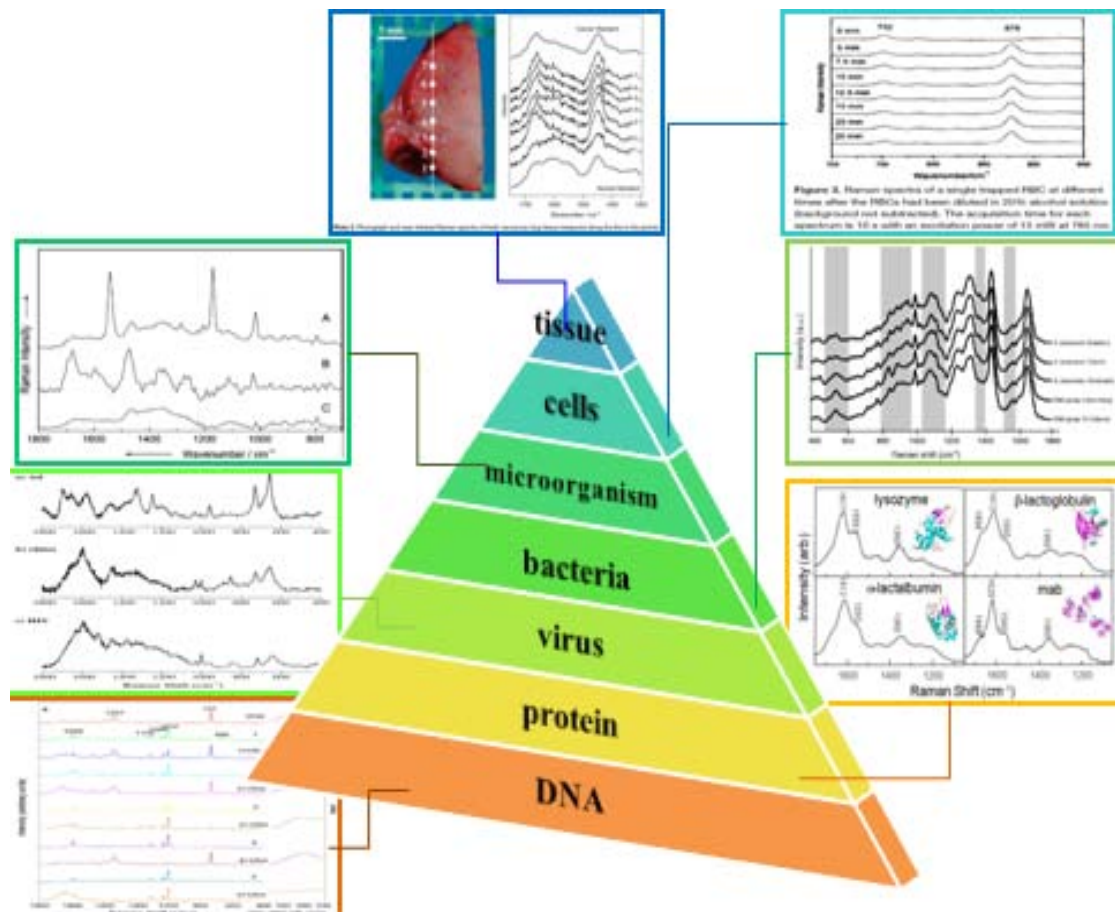


圖 1- 15 拉曼光譜於生醫的應用廣度

1.3.5 表面增顯拉曼光譜

1.3.5.1 表面增顯拉曼光譜原理

1978 年時，表面增顯拉曼散射效應 (Surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS) 被 Fleischmann 等人發現，利用銀表面吸附分子，其所產生的拉曼光譜比原本訊號更高達百萬倍之多，之後也陸續證實許多的分子和金屬，皆可產生此效果。而構成表面增顯拉曼的因素有兩種：電磁增顯機制和化學增顯機制[51-53]。

1.3.5.2 電磁增顯機制

因入射光源的激發，造成奈米金屬微粒或粗糙的金屬表面產生表面電漿共振的原理，進而產生偶極化的現象，藉由附近電場增強以增強拉曼訊號。當粒子內徑的大小接近於光波長時，其增顯效應並不明顯。然而其粒子大小其實和增顯所需要的激發頻率有很大的關係。較小的粒子代表著共振頻率也較窄，所需要的偶極表面電漿激發也較特殊；較大的粒子也相對應著較多極電漿的激發。

表面電漿共振所需符合的條件：

1. 金屬奈米粒子的內徑有所限制，其內徑大小要小於光波長。
2. 入射激發光的頻率和散射光的頻率要接近金屬表面電漿共振的頻率。
3. 物質要貼近金屬表面，越近越好。

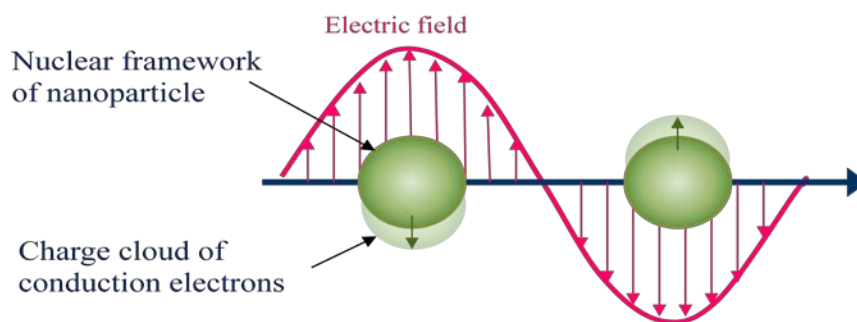


圖 1-16 表面電漿共振

1.3.5.3 化學增顯機制

其金屬表面與待測物產生電荷轉移的作用，也就是待測物的共振拉曼散射。當待測物受到光的激發後，其光子所散失的能量轉為電子而躍遷到激發態的能量。而此激發後的熱電子會經由圖 1- 17 中的(a)途徑躍遷到最低未填滿的分子軌域，這就是一般共振拉曼的過程。而化學增顯主要的影響因素為待測分子必須要盡可能靠近奈米金屬表面，使得熱電子在躍遷的時候可以直接由奈米金屬的傳導帶直接到達最低未填滿的分子軌域，而在到達之後又回到金屬的傳導帶。

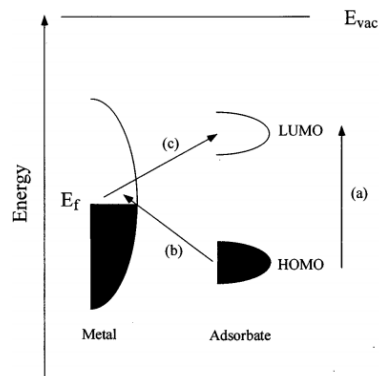


圖 1- 17 拉曼光譜於分子金屬的能階躍遷圖[52]

表面增顯光譜的條件

綜合以上特色，在此將列出表面增顯光譜(SERS)所需要的條件：

1. 待測物必須與金屬奈米結構的表面相當接近。
2. 具有粗糙度的金屬表面也會有相當的增顯效應。
3. 所選用的激發雷射波長種類必須要接近其金屬的吸收波長。
4. 通常選用奈米金、奈米銀或奈米銅，再加上配合奈米金屬的粒子大小(約 20-200 nm)，會得到較高的增顯效應。

1.4 研究架構

本研究主要分為三個部份：

- **第一部份**：主要是針對臨床上的細菌和噬菌體進行研究，並且構建資料庫，以利後續的分析和比對。
- **第二部分**：將同種但不同的細菌嘗試利用拉曼光譜進行檢測和分析，以期鑑別出各自差異。
- **第三部分**：將利用表面增顯拉曼效應的原理，將奈米粒子與細菌和噬菌體混合，以探討其圖譜的增顯效果。

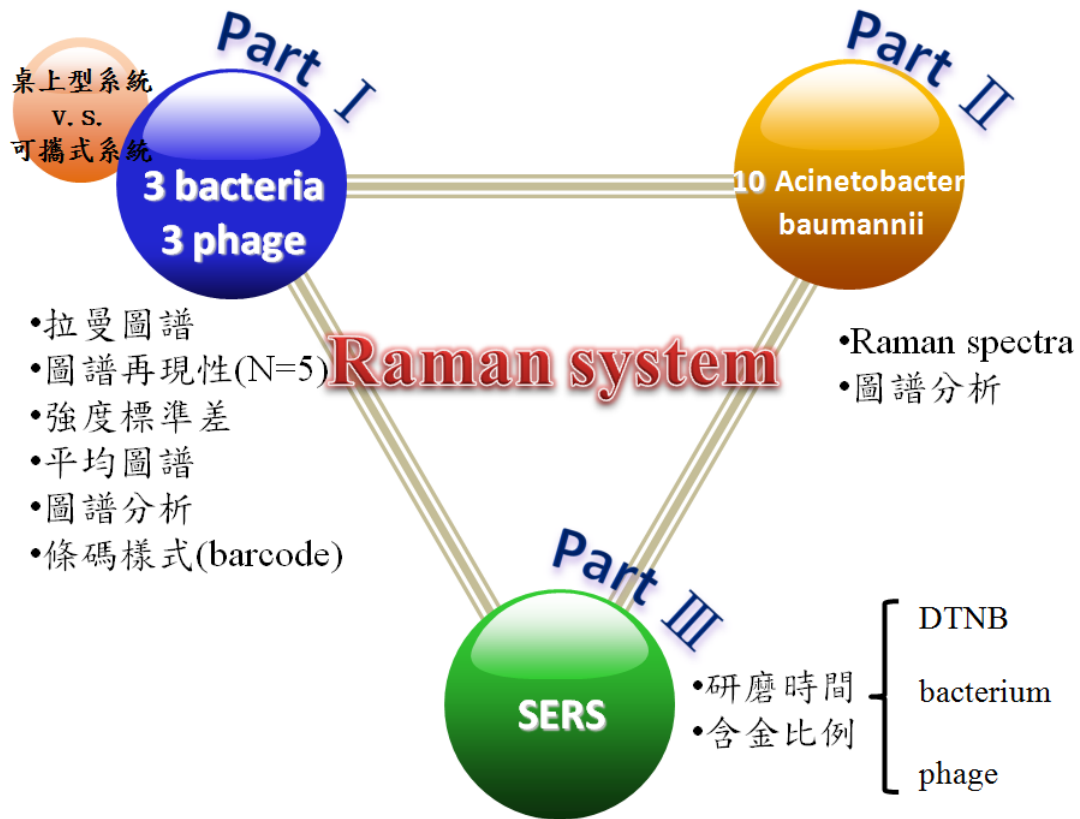


圖 1-18 研究架構示意圖

第二章 研究設備與方法

2.1 研究設備

1. 無菌操作台(Laminar flow)

亮盛企業有限公司，型號為 JW-3N，台中，台灣。

2. 培養箱(Incubator)

低溫恆溫震盪培養箱，亮盛企業有限公司，型號 LA-150，台中，台灣。

3. 滅菌釜(Autoclave)

高壓蒸氣滅菌釜，TRIDENT，型號為 EA635，伊斯坦布爾，土耳其。

4. 分析天平(Analytical balance)

為 Sartorius 廠牌，型號為 TE2MS，台北，台灣。

5. 濁度計(Turbidmetry)

廠牌為 Biochrom，型號為 CO7500，柏林，德國。

6. 微量低溫離心機(Microlitre Centrifuges)

微量冷凍離心機，Hettich 廠牌，型號為 2205-01，紐約，美國。

2.2 拉曼儀器介紹(Raman microscopy)

為了考量未來臨床或是現在使用方便性，本研究使用小型可攜式和高階桌上型系統，比較其結果差異。

小型可攜式系統

本實驗室採用BWTEK公司生產的i-Raman系統，其雷射波長為785 nm，配有的物鏡倍率為20X，光譜分辨率約為 3 cm^{-1} ，並且搭配BwRam 1.1軟體，可進行雷射光的大小和累計次數及時間的調整。此外，此軟體亦附有去背景訊號和平滑化的功能。

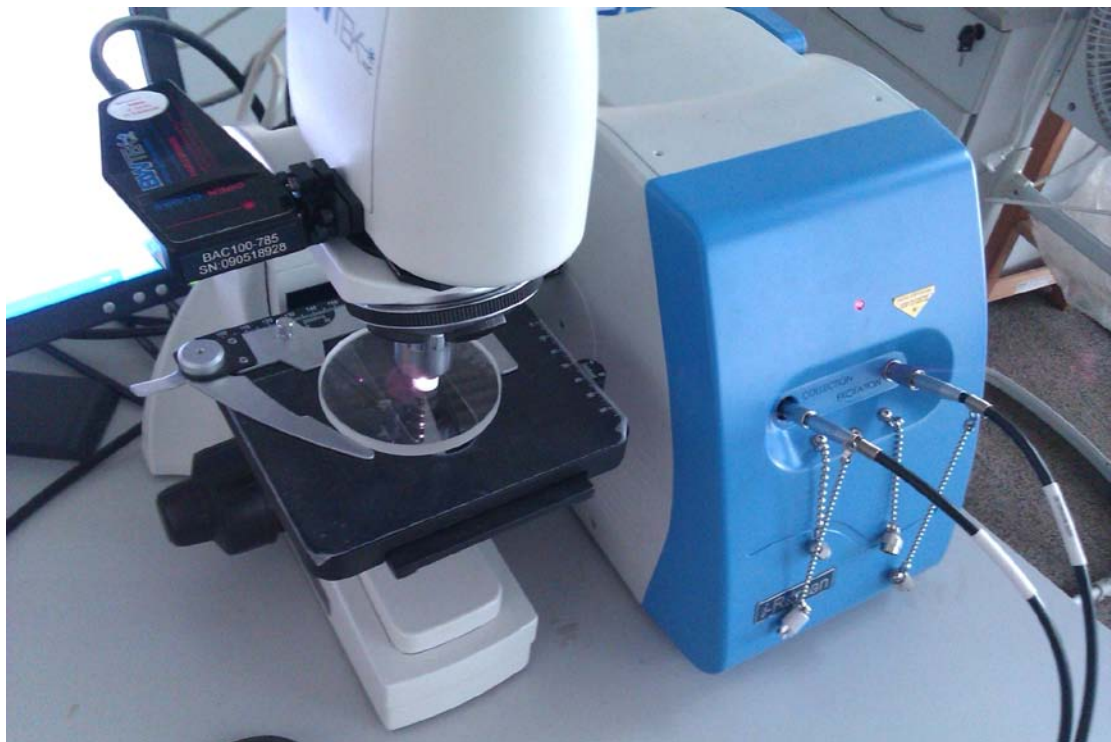


圖 2- 1 BWTEK 公司 i-Raman 系統

桌上型高階式系統

成功大學醫工所 張憲彰老師實驗室所採用的拉曼光譜乃Thermo Fisher SCIENTIFIC 公司的DXR Raman microscope，其分別有雷射光源 532 nm、633 nm和780 nm，光柵則分別為900-lines/mm、600-lines/mm和400-lines/mm，以及配有正立式顯微鏡X-Y stage，其解析度為1 μm ，並且配有物鏡分別為10X、50X和100X，搭配其軟體 Omnic for Dispersive Raman，可調整雷射的輸出能量和進行confocal和mapping。



圖 2- 2 Thermo Fisher SCIENTIFIC 公司的 DXR Raman microscope

2.3 實驗樣本取得

2.3.1 細菌和噬菌體

本研究的細菌和噬菌體樣本，皆由義守大學生物技術與化學工程研究所 洪志勳老師實驗室所提供。本研究所使用的細菌和噬菌體樣本分別為：沙門氏菌(*S.choleraesuis*, Ed2)、鮑式不動桿菌(*A. baumannii*, KM18)和克雷伯氏菌(*K. pneumonia*, NK5)，其相對應之噬菌體 ϕ L2、 ϕ KM18及 ϕ NK5。

2.3.2 *A. baumannii* 菌株

由義守大學化工系 洪志勳老師提供，(表 2- 1) 10 株 *A. baumannii* 菌株之抗藥資訊(下頁)。

表 2- 2 10 株 A. baumannii 菌株之抗藥資訊

Lab NO	來源	Amikacin	Ampicillin	Ampicillin-Sulbactam	Aztreonam	Cefazolin	Cefepime	Cefmetazole	Cefotaxime	Ceftazidime
100TCP1	Sputum	R	R	R	R	R	R	R		R
100TCP5	Blood	R	R	R	R	R	R	R		R
100TCP6	Sputum	R	R	R	R	R	R	R		R
100TCP8	sputum	R	R	I	R	R	R	R		R
100TCP10	-	R	R	R	R	R	R	R		R
100TC16	呼吸器面板	S	R	S	R	R	R	R		R
100TC28	抽痰器等	S	S	S	S	S	S	S		S
100TC29	RCW 水龍頭	S	R	S	R	R	S	R		S
100TC32	腋下	S	S	S	S	S	S	S	I	S
100TC35	抽痰器等	S	R	S	R	R	S	R	I	S
Lab NO	Ceftriaxone	Ciprofloxacin	Colistin	Ertapenem	Gentamicin	Imipenem	Levofloxacin	Meropenem	Piperacillin-Tazobactam	Trimethoprim-Sulfamethoxazole
100TCP1	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
100TCP5	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
100TCP6	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
100TCP8	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
100TCP10	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
100TC16	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S
100TC28	I	S	S	S	R	I	S	I	R	R
100TC29	I	S	S	R	S	R	S	R	R	S
100TC32	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
100TC35	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S

2.3.3 表面增顯奈米粒子

此材料則由成功大學醫工所 張憲彰老師實驗室所提供，使用SiO₂包覆Au奈米粒子，並且改變其研磨時間(和粒子大小有關)，和含Au比例進行比較。

2.4 樣本濃度的配置

在此實驗所使用的細菌濃度皆是以10⁹ CFU/ml為基準，而噬菌體的濃度皆是以約10¹⁰-10¹² PFU/ml為主。

- 生物樣本及*Acinetobacter baumannii*菌株：以直接將固定濃度的菌(10⁹ CFU/ml)和噬菌體(10¹⁰-10¹² PFU/ml)，並用拉曼光譜進行檢測。
- SERS：以DTNB、細菌和噬菌體加入增顯粒子部分，奈米粒子皆是以0.002 mg/ml 的條件配製，在改變磨製時間的奈米粒子實驗部分(15 min、30 min、45 min)，是以DTNB(10⁻³、10⁻⁵、10⁻⁷ M)細菌(離心過後)和噬菌體(10¹⁰-10¹² PFU/ml)以1：1的比例加入奈米粒子中。在改變含金比例的粒子實驗中(0%、2%、8%、13%、30%)，則各別以改變DTNB的濃度(10⁻³、10⁻⁵、10⁻⁷ M)、細菌的濃度(0.2 ml、0.4 ml、0.6 ml、0.8 ml, 10⁹ CFU/ml)離心後和噬菌體(0.02 ml、0.04 ml、0.06 ml、0.08 ml)以1：1混合。在此也配製了對照組進行比對，對照組則是將加入增顯粒子的部分改為去離子水，以達同樣的稀釋倍數。

2.5 樣品的檢測方式

將細菌從培養皿上以無菌棉棒刮下，加入無菌去離子水中，利用濁度計將其濃度調整為 10^9 CFU/ml，再吸取2 μ l滴在鍍Ti或Au的基材上，並將滴有待測物的基材製於培養皿中，利用其液滴的對流與蒸散作用自然乾燥，使樣本濃縮[54-55]，再利用拉曼光譜進行檢測。噬菌體部分則是以 10^{10} - 10^{12} PFU/ml的濃度，直接滴在基材上，利用同樣方式進行檢測。

加入增顯粒子部分，則是以表 2-3的方式進行配製，在配製前，細菌調製完比例會先利用離心方式進行濃縮，去除上清液後，再加入增顯粒子後以震盪器進行震盪，以達充分混合。另外，在此也配製了對照組進行比對，對照組則是將加入增顯粒子的部分改為去離子水，以達同樣的稀釋倍數。DTNB和噬菌體則是無需離心，其於步驟皆相同。

	DTNB (10^{-3} 、 10^{-5} 、 10^{-7} M)	Bacteria (10^9 CFU/ml)	Phage (10^{10} - 10^{12} PFU/ml)
磨製時間不同 (15 min、30 min、45 min)	20 : 20	20 : 20	20 : 20
含金比例不同 (0%、2%、8%、13%、30%)	20 : 50	20 : 200、400、600、800	20 : 20、30、40、50

表 2-3 奈米金與其樣品配置的比例(μ l)

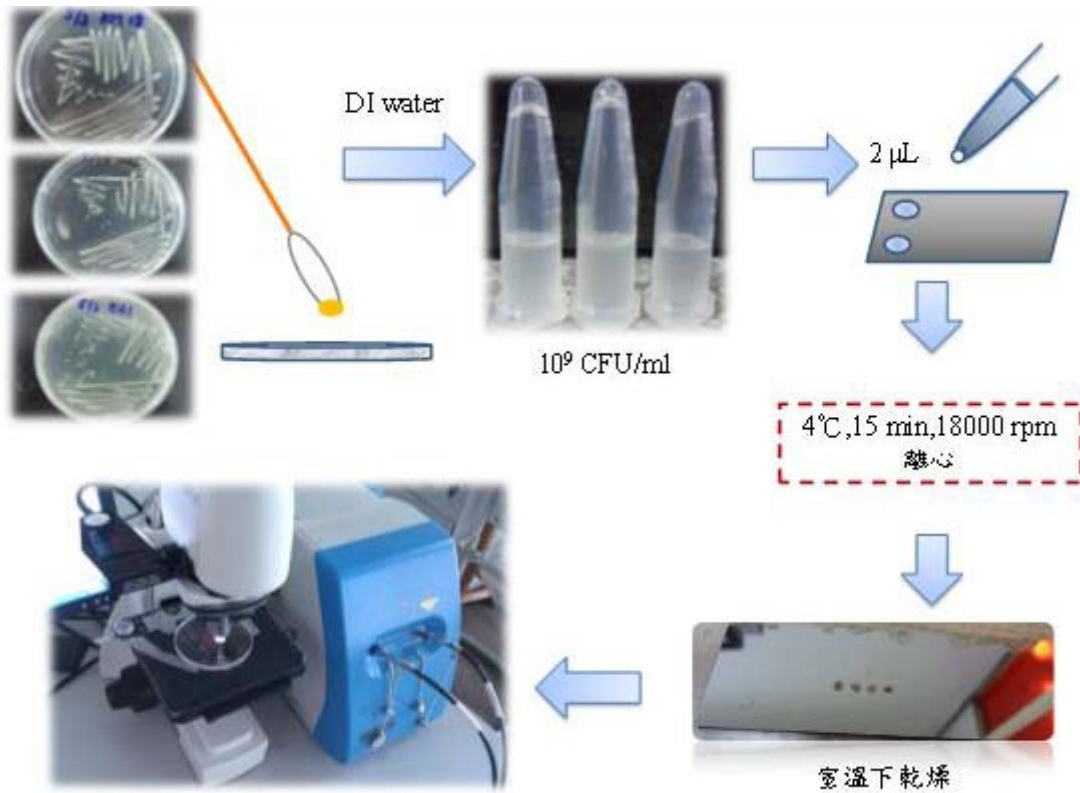


圖 2-3 利用拉曼光譜檢測細菌和噬菌體之實驗流程

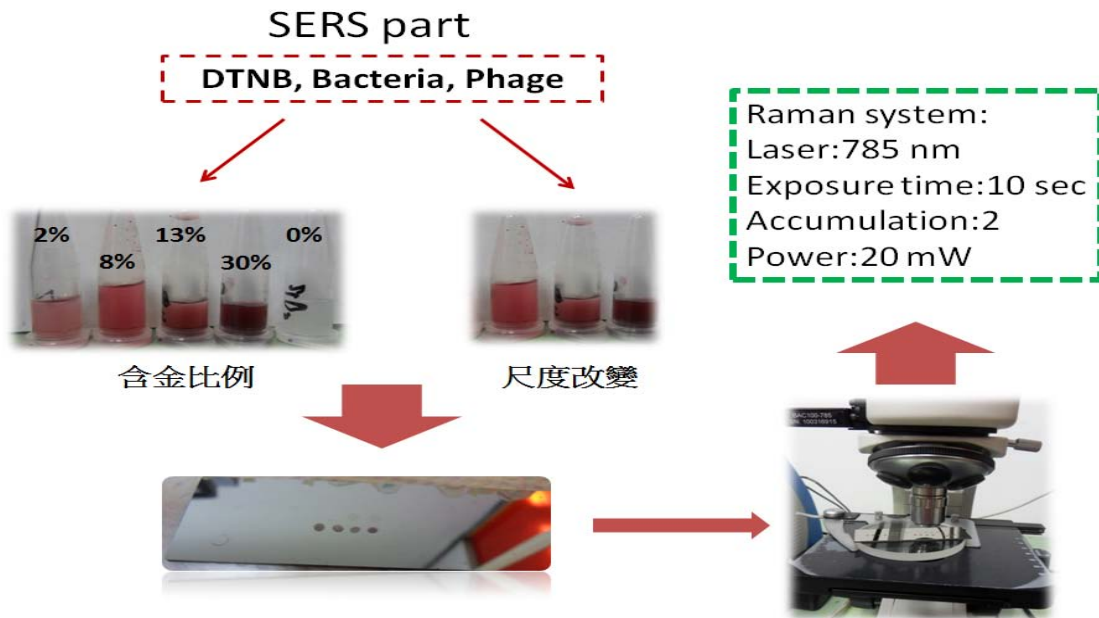


圖 2-4 加入奈米金之實驗過程

2.6 實驗數據處理

首先，在每次實驗之前，都會以 Si 晶片進行校正(波峰約在 520 cm^{-1})，以確定每次所使用的雷射能量和之前一樣和官能基位置沒有錯置(圖 2- 5)。之後利用將待測物放上載台，得到其光譜。由於所得到的光譜其背景訊號較大，於是我們利用軟體(BwRam)，將其去除背景值(圖 2- 6)。如此一來就可得到最後的光譜數據，並將光譜數據匯出，再進行平均，以提高本研究對官能基的判斷。之後將以平均的光譜利用軟體進行平滑化(Savitrky-Golay 方法，參數為 5)，逐一標準化，將整個光譜等倍放大，將其最強大強度調整至 100，最小強度調整至 0，以利於之後的圖譜比較(圖 2- 8)。在此本研究也先收集了基材的訊號，以確定並不會影響其樣本的指紋圖譜。

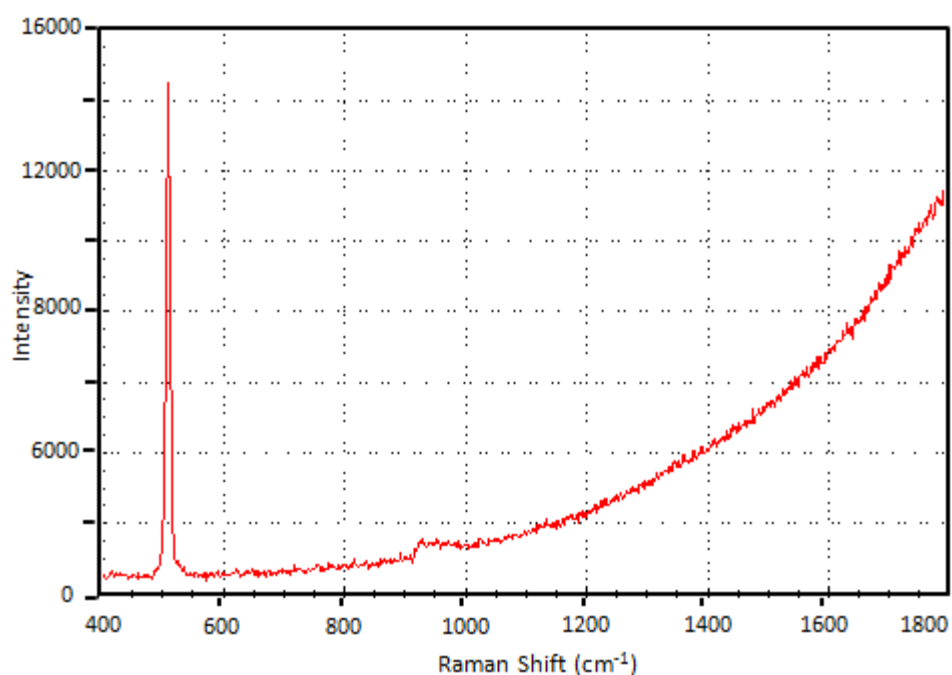


圖 2- 5 利用 Si 校正光譜所得圖譜

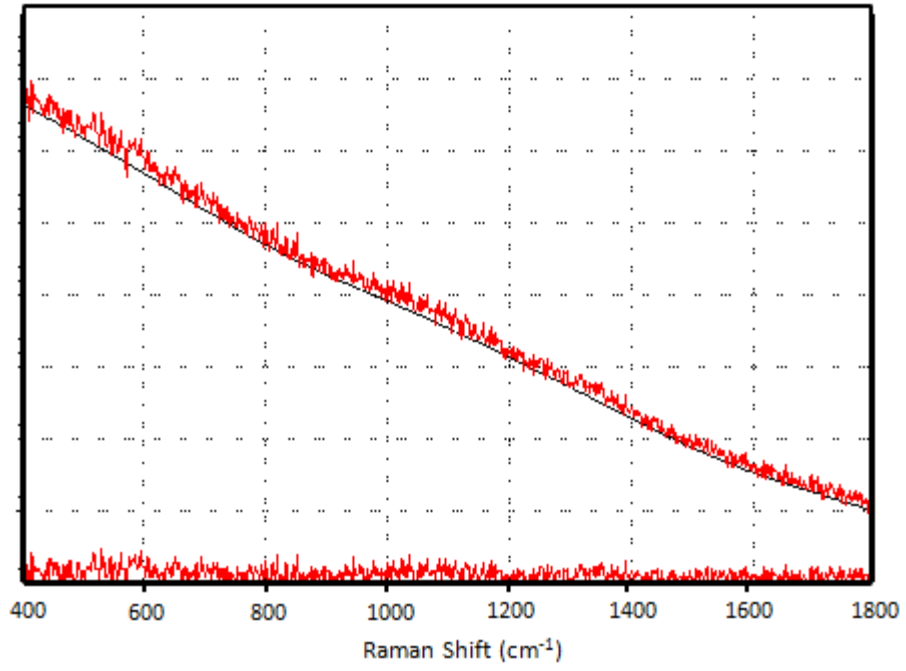


圖 2-6 圖譜去除背景螢光

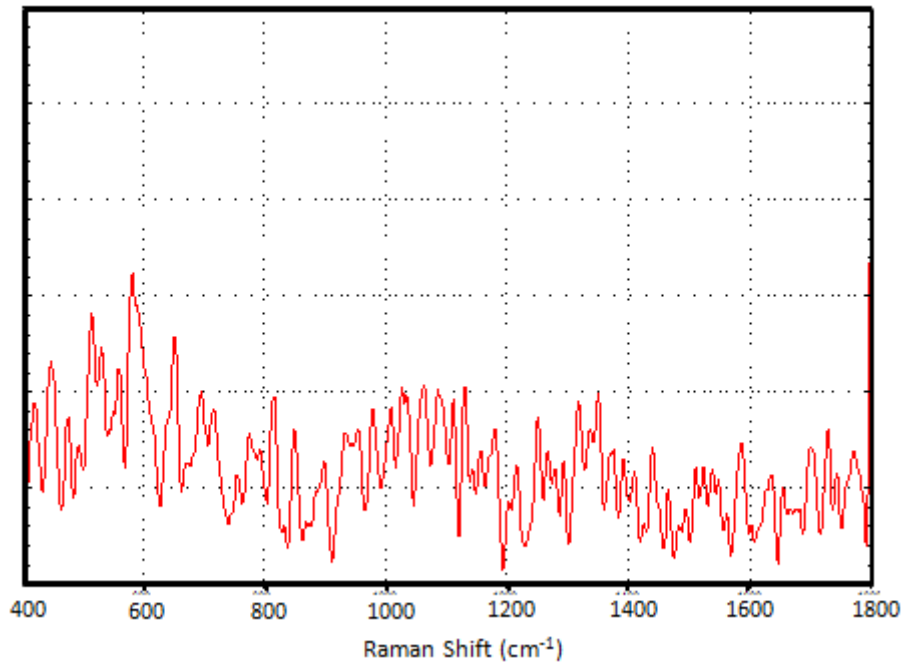


圖 2-7 去除背景值後之圖譜平滑化處理

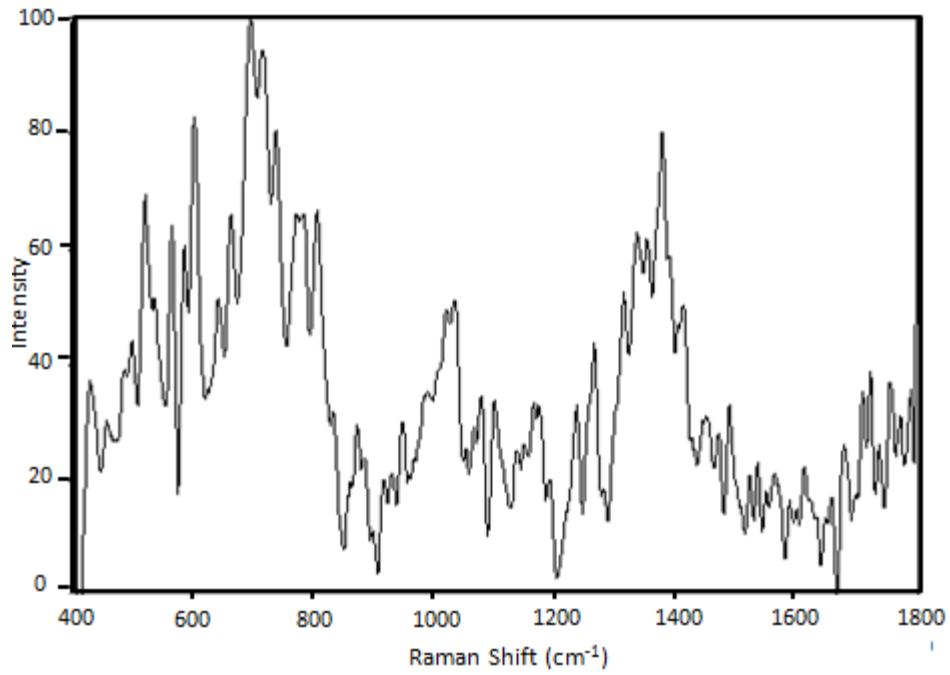


圖 2-8 最終所得指紋圖譜

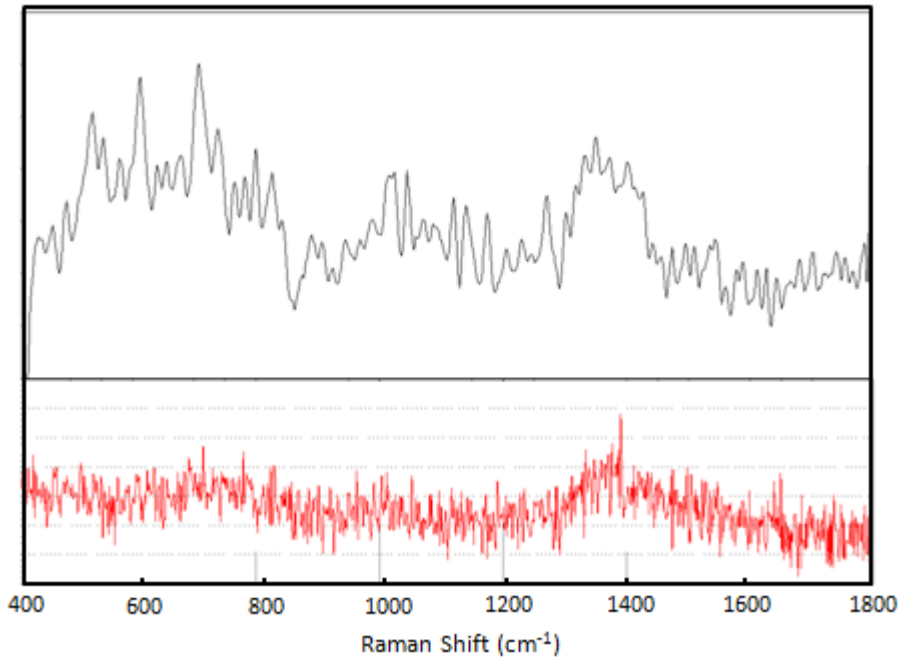


圖 2-9 可攜式 i-Raman 之生物樣本訊號(上)與基材訊號(下)

由成大醫工所桌上型拉曼系統(Thermo Fisher SCIENTIFIC 公司的 DXR Raman microscope)所得到的光譜圖，由系統不同，所以使用不同的數據處理方式。首先我們得到的圖譜如圖 2- 10。並利用軟體(OMNIC for Dispersive Raman)的 Automatic Baseline Correct 功能，自動去背景值，如圖 2- 11，藍色是原本的光譜圖，而紅色為去背景值後之圖譜，但是發現在 1100-1800 cm^{-1} 區域的螢光效應似乎無法用此方式去除。於是我們使用軟體中的 Baseline Correct，以手動的方式去除背景螢光，所得結果如圖 2- 12。在手動去除螢光的部分，首先結點固定於特定 X 軸的位置上，以避免每次去除螢光時，所產生的值標準差過大。唯一可能會有標準差的是在於強度問題，可能因為結點設的高低落差造成強度不同，但由於目前本研究主要是以看特徵峰的方式，所以在此先暫不深入探究其強度標準差。

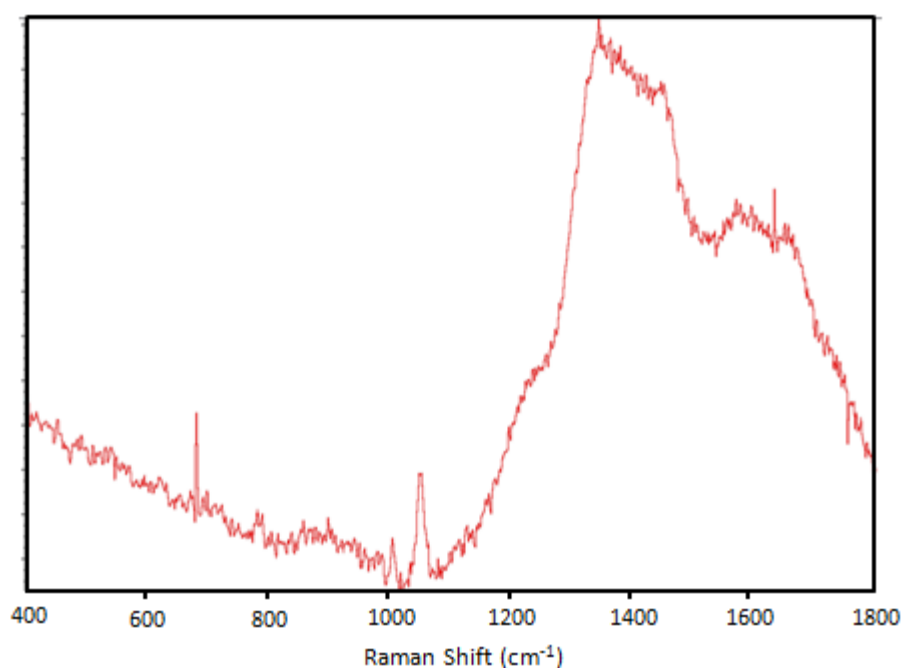


圖 2- 10 桌上型拉曼系統所得圖譜

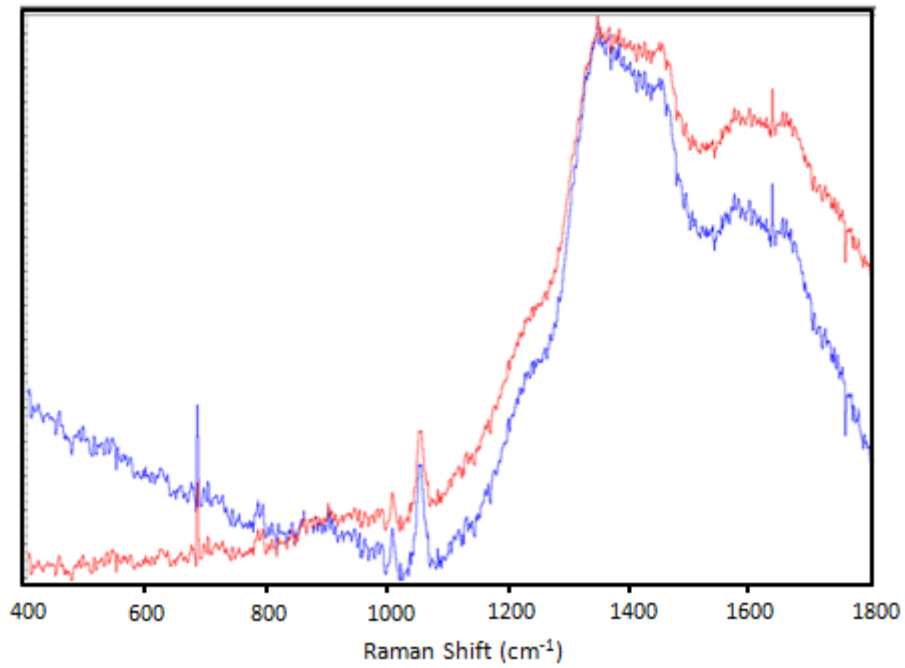


圖 2-11 桌上型拉曼系統所得之原圖譜(藍)和去背景值後圖譜(紅)

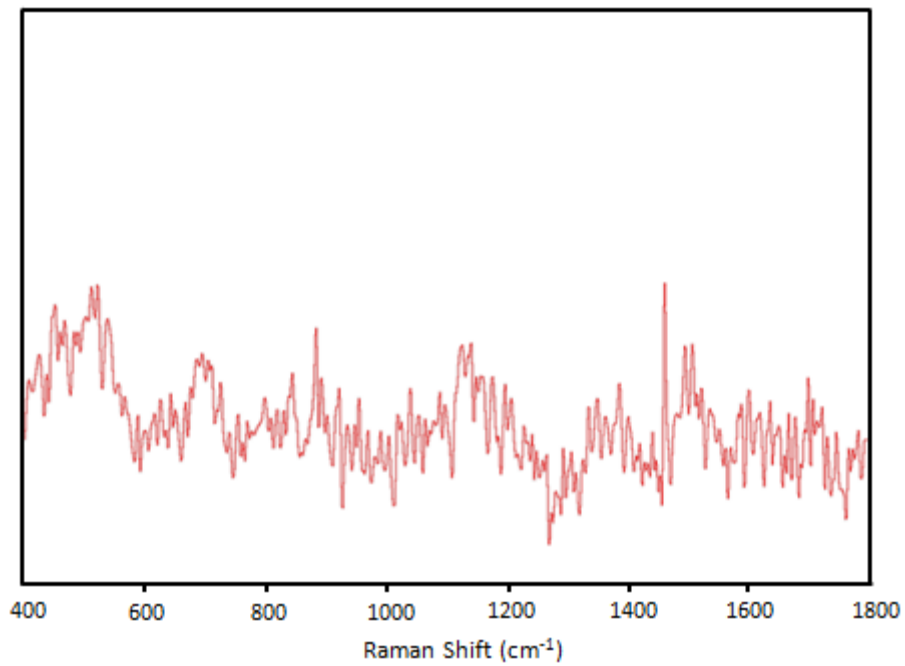


圖 2-12 桌上型拉曼系統所得圖譜

第三章 結果與討論

3.1 生物樣本指紋圖譜

3.1.1 細菌指紋圖譜

根據文獻指出，生物分子中重要的生化訊息，通常會在 $400-4000\text{ cm}^{-1}$ 的拉曼位移左右，所以我們在此將圖譜取至 $400-1800\text{ cm}^{-1}$ 的拉曼範圍。首先針對細菌和噬菌體進行單一的檢測，所以在此本研究先提供細菌的圖譜資訊。在此我們先由 Ed2 的單一圖譜。由於本研究利用桌上型拉曼系統所得圖譜皆由五次實驗數據所平均而成，所以在此我們也將五條平均圖譜置於圖 3-2，每條圖譜趨近於相似，但由於本研究並沒有特地去限制細菌的生長週期，並未在特定細菌生長周期檢測，所以在強度上仍然會有不同，於是本研究也利用平均值結合標準差於圖 3-3，以標定出本研究中的圖譜強度範圍。

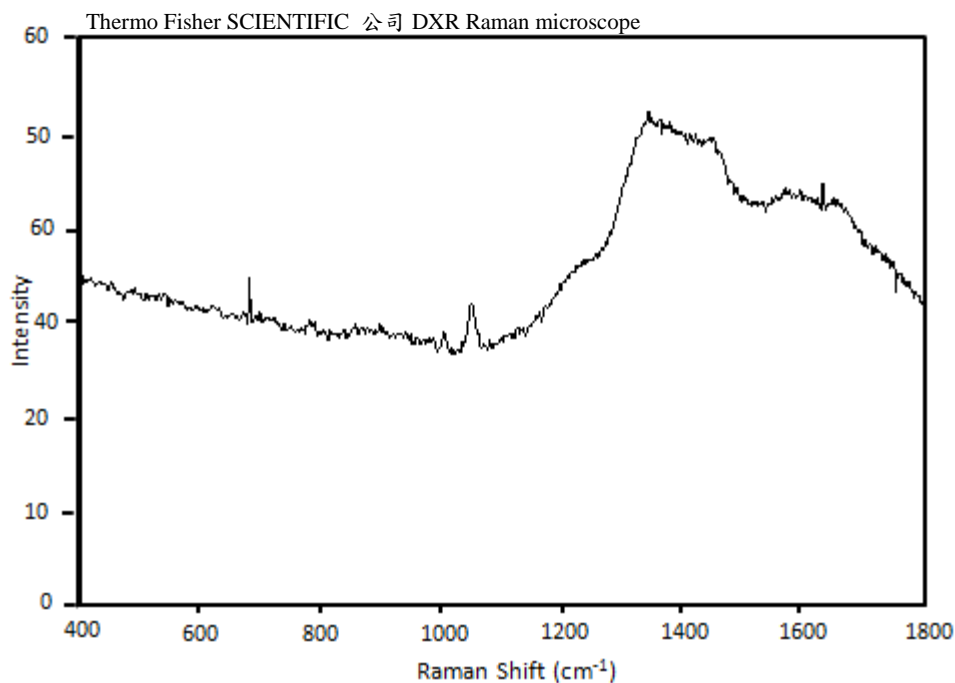


圖 3-1 Ed2 之單一拉曼光譜

Thermo Fisher SCIENTIFIC 公司 DXR Raman microscope

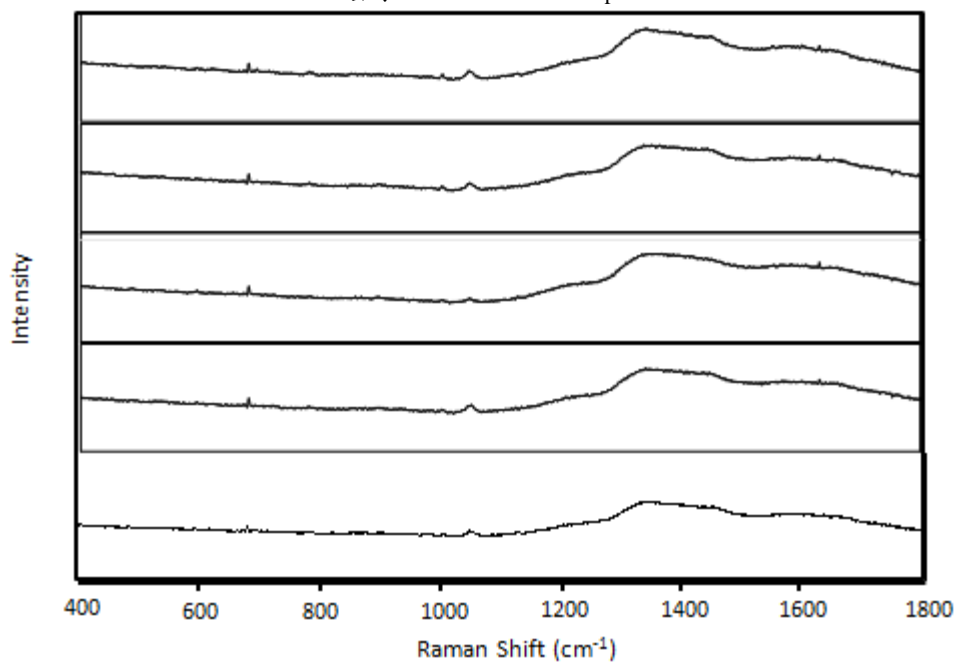


圖 3- 2 Ed2 圖譜再現性特性(N=5)

Thermo Fisher SCIENTIFIC 公司 DXR Raman microscope

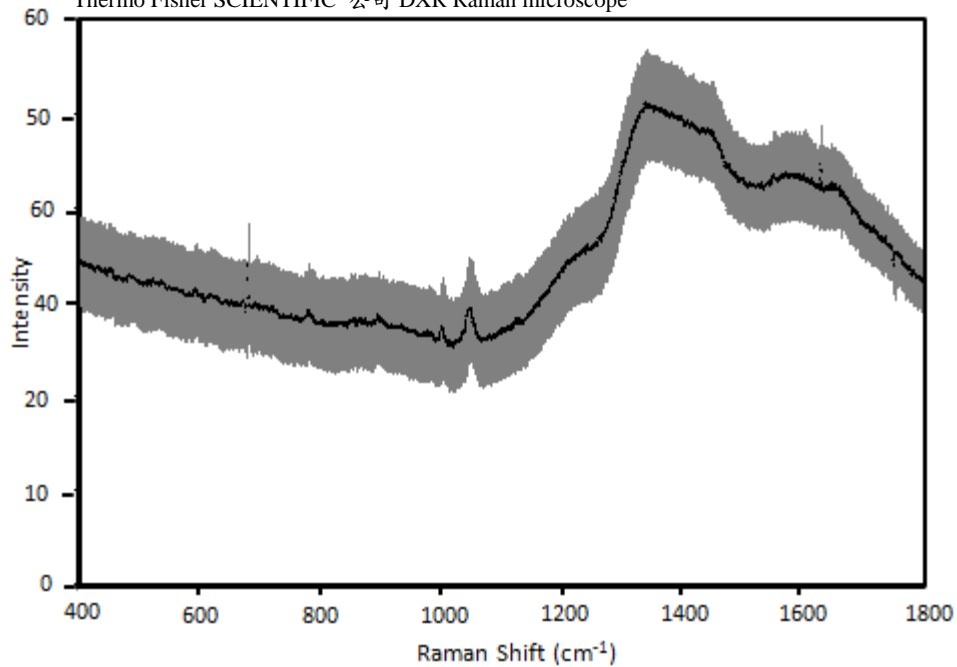


圖 3- 3 Ed2 之強度標準差

將其五條圖譜進行平均，但如先前所說，先以去背景值的方式修掉圖譜的背景值，由於生物分子都會有其自身的螢光，所以會反應於圖譜顯示，在修完背景值後的圖譜，於 1100-1800 cm^{-1} 處的螢光並不利於我們進行特徵峰的判別和比較，所以我們必須將其螢光以手動的方式修掉。手動修除後，將兩段光譜各自標準化，將其最大值以等比例放大至強度 100 處，而最小值至 0。再將兩段圖譜組合，如圖 3-4。

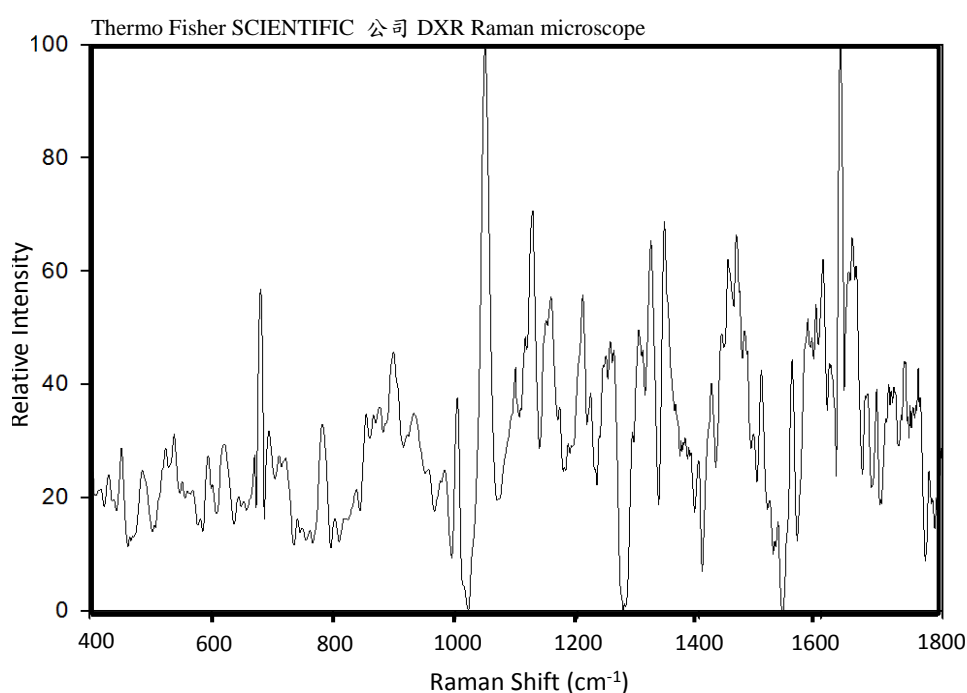


圖 3-4 Ed2 之 400-1100 及 1100-1800 cm^{-1} 光譜組合

依序如 Ed2，以下則為 NK5 的單一指紋圖譜(圖 3-5)，並將五次所收集到的光譜圖呈現於圖 3-6。本研究亦將所得圖譜的範圍以標準差的方式呈現，如圖 3-7。並且將 NK5 最後的圖譜呈現於圖 3-8。另一菌株 KM18 之單一圖譜、五次光譜、標準差和最後圖譜則分別呈現於圖 3-9、圖 3-10、圖 3-11 和圖 3-12。

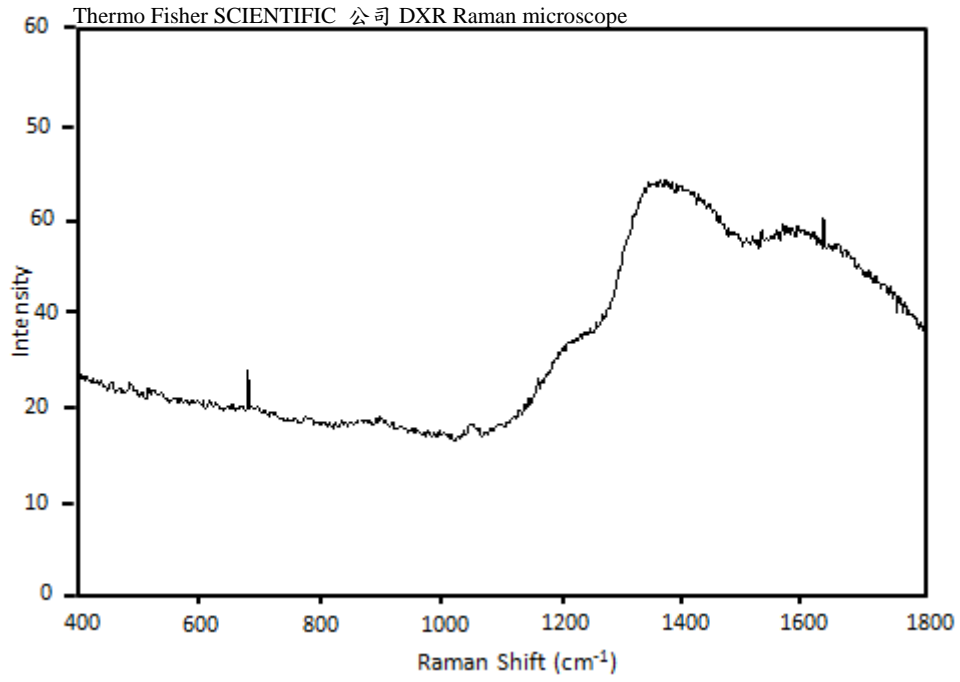


圖 3- 5 NK5 的單一拉曼圖譜

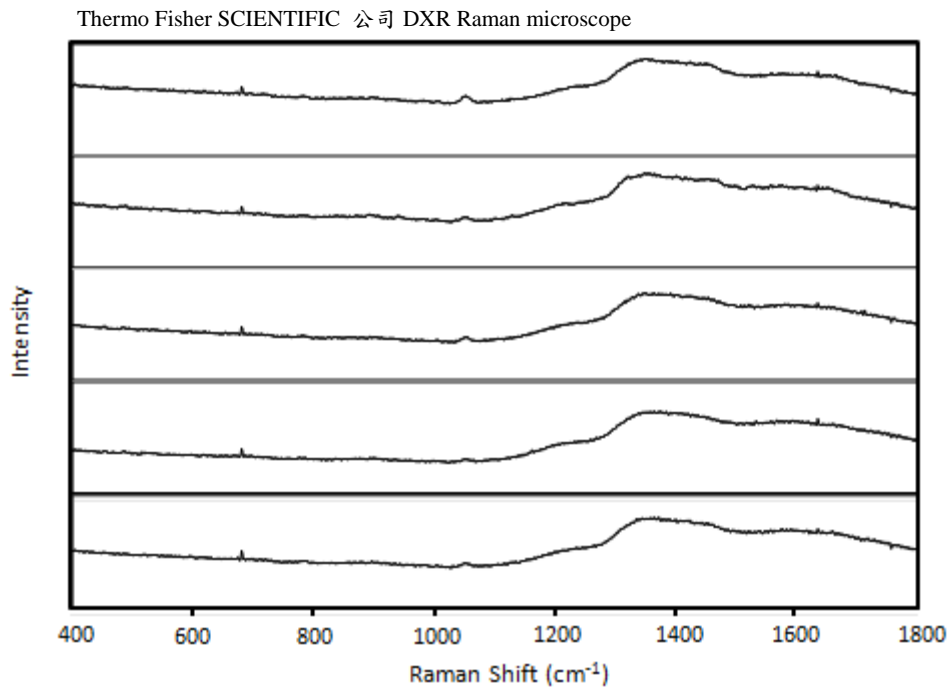


圖 3- 6 NK5 圖譜再現性特性(N=5)

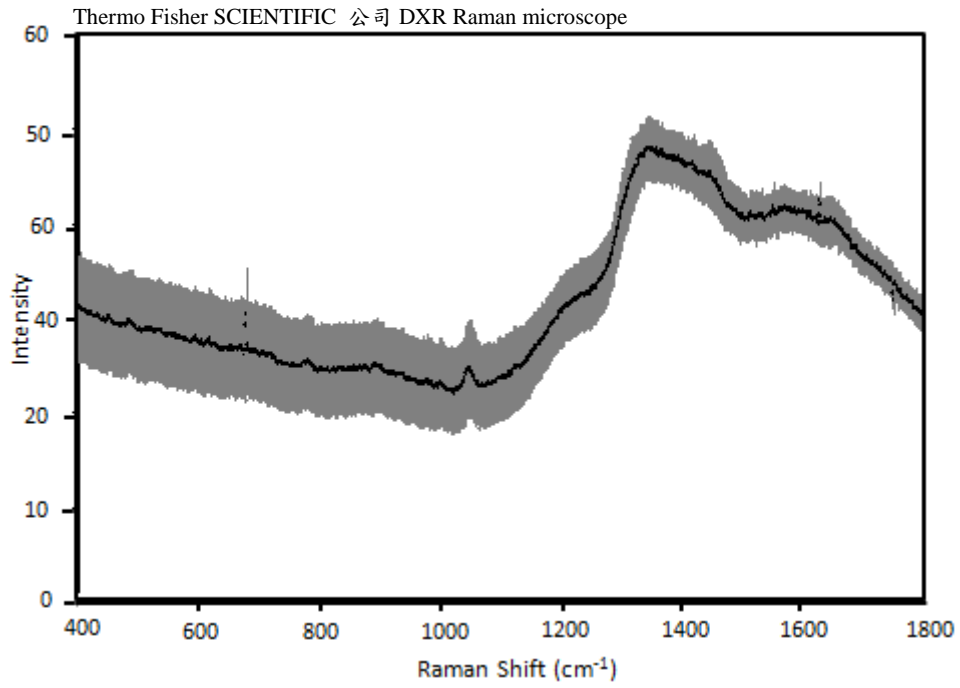


圖 3-7 NK5 之強度標準差

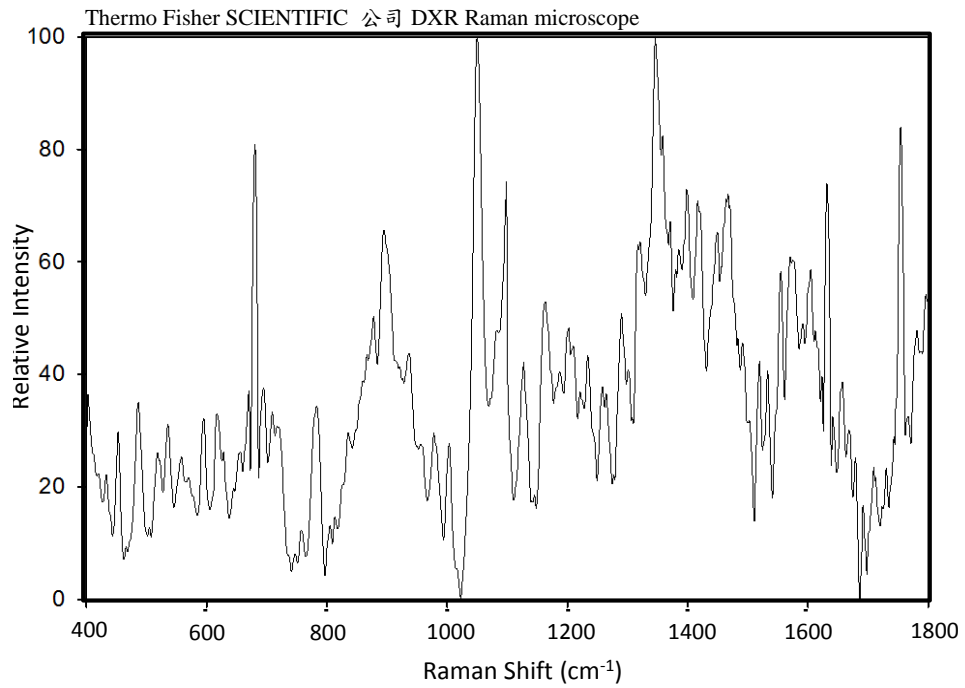


圖 3-8 NK5 之 400-1100 及 1100-1800 cm^{-1} 光譜組合

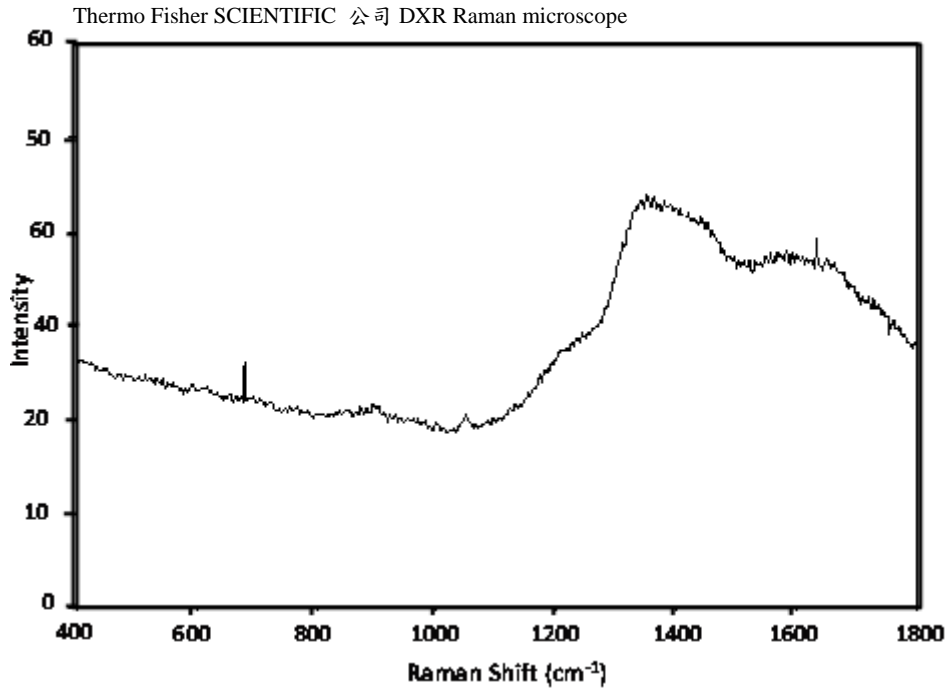


圖 3-9 KM18 的單一拉曼圖譜

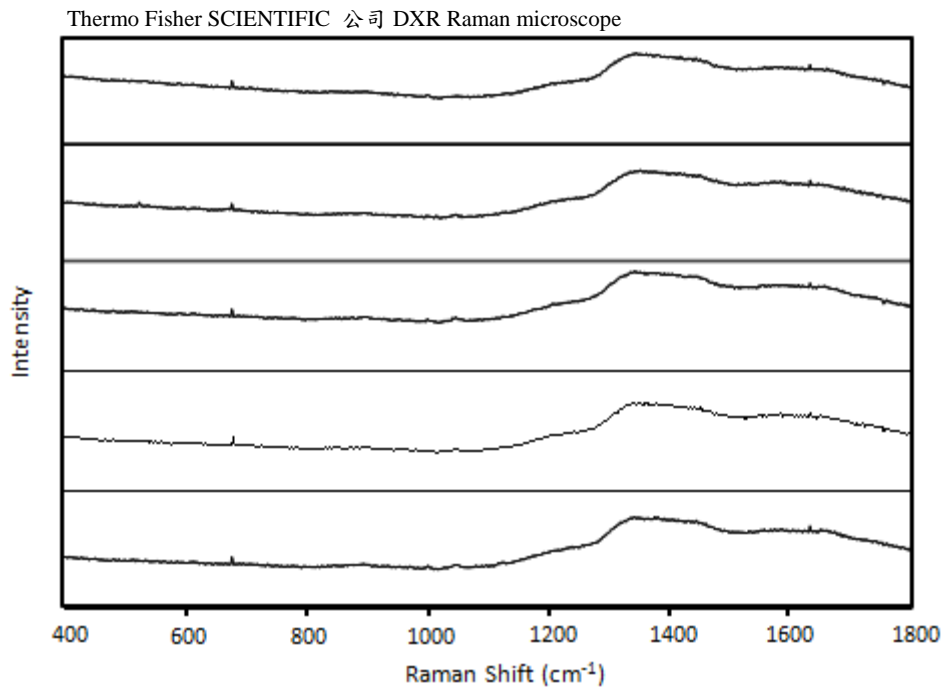


圖 3-10 KM18 圖譜再現性特性(N=5)

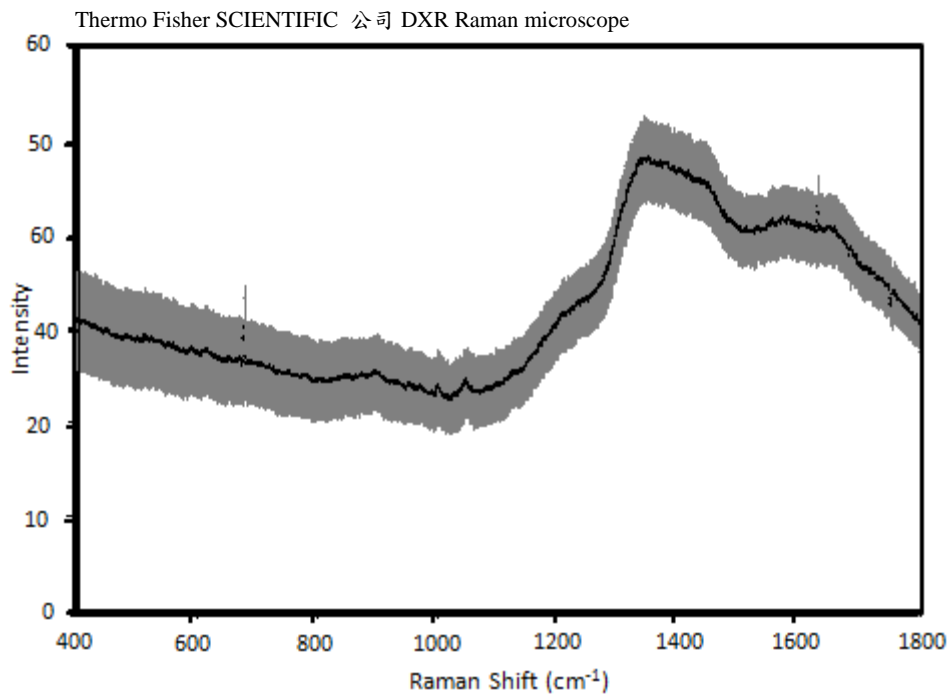


圖 3- 11 KM18 之強度標準差

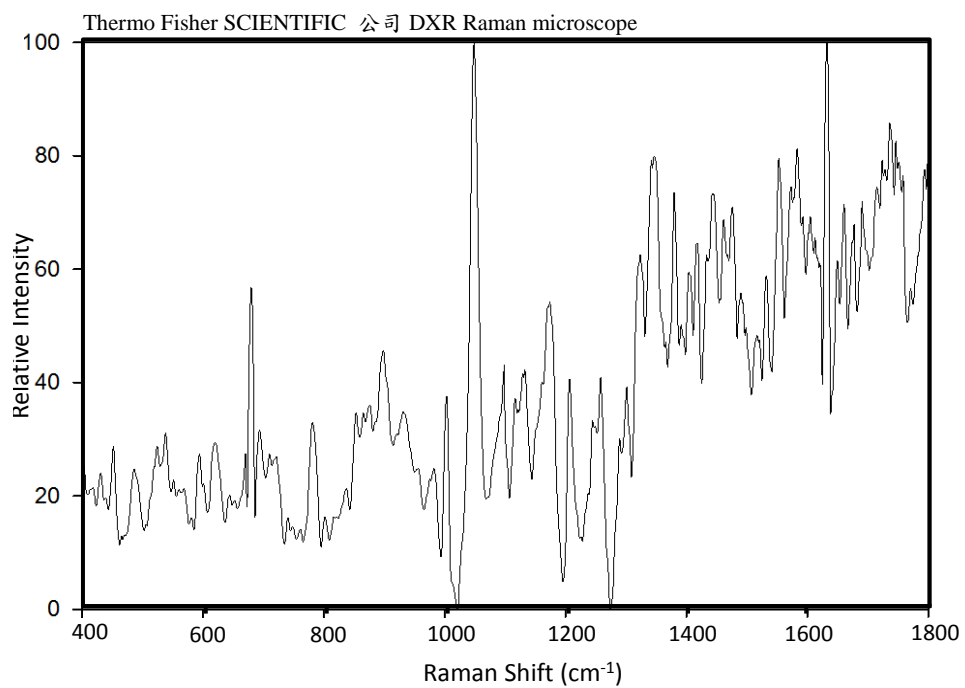


圖 3- 12 KM18 之 400-1100 及 1100-1800 cm^{-1} 光譜組合

由於一般細菌本身的生化組成本來就沒有太大的差異，加上此三株細菌又皆屬革蘭氏陰性菌，因此在結構上的差異亦不會太大，因此這三株菌的指紋圖譜乍看之下大致相同，和文獻報導呈現有相似結果。但雖然生化組成和結構差異並無太大，然不同菌株具有不同的特性，可能導致其菌株相較之下所含的生化組成的含量會有所差別，於是在此本研究將原圖譜拆成兩段，分別為 $400-1100\text{ cm}^{-1}$ 和 $1100-1800\text{ cm}^{-1}$ ，並且將其三株菌的指紋圖譜進行疊加，以利於比對。在此本研究也將依其圖譜，進行三個階段的分析，分別為圖譜特徵峰比較、特徵峰強度比較和定義其官能基的種類。

特徵峰比較

疊加圖譜後，在此將其分別標上不同的記號，藍色直線表示三株菌皆有的特徵峰；紅色箭號表示為僅此株菌有的特徵峰，另外兩株則沒有；黃色三角表示其於兩株菌皆有，僅有此株菌沒有的特徵峰；橘色陰影區域則表示為此區域分別有所差異。在此分別以不同顏色代表不同的菌株，藍色為 KM18，綠色為 NK5 和黑色的 Ed2。由 $400-1100\text{ cm}^{-1}$ 區域圖譜可以發現，KM18 的 469 、 738 和 954 cm^{-1} 處，有著另外兩株所沒有的特徵峰，而在 NK5 的 853 cm^{-1} 和 Ed2 的 525 、 654 cm^{-1} 位置，則僅有此菌株沒有，其於兩株皆有其明顯的特徵峰。而在 451 、 485 、 539 、 594 、 616 、 680 、 780 、 898 、 978 、 1003 和 1048 cm^{-1} 則是三者皆有且明顯的特徵峰，我們將於後面會定義其官能基。

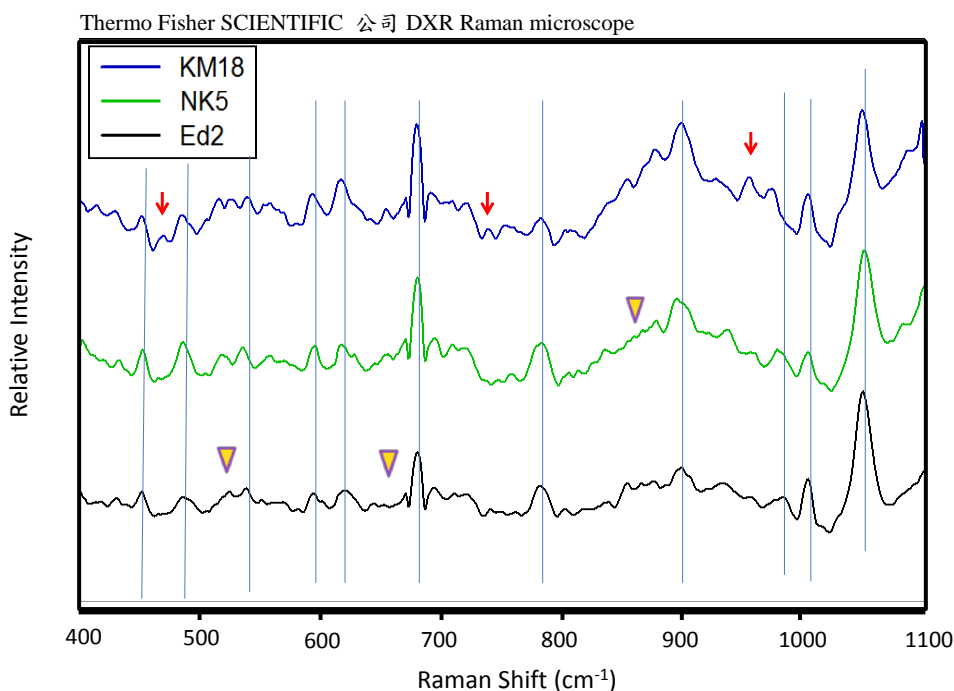


圖 3- 13 Ed2、NK5、KM18 於 400-1100 cm⁻¹ 區域之拉曼光譜

在其後段光譜的部分，則以同樣的方式表示其圖案所代表的意義。相互比較之後，在 KM18 的 1379 cm⁻¹ 處、NK5 的 1754cm⁻¹ 處和 Ed2 的 1502 cm⁻¹ 位置，皆是特有的特徵峰，而 1126、1207、1319、1346、1418、1445、1532、1553、1603、1633 和 1692 cm⁻¹ 處，三者皆有明顯特徵峰。另外，在 1145-1200、1230-1275、1275-1308 和 1457-1485 cm⁻¹ 區域則在型態上有明顯的不同。在 1230-1275 處，KM18 有兩個明顯的峰在 1245 和 1257 cm⁻¹ 處，但在 NK5 處卻是在 1232 和 1262 cm⁻¹ 有明顯峰值，然在 Ed2 卻看不出來有峰值的存在。而 1275-1308 cm⁻¹ 區域則是皆有兩個特徵峰，分別為 1289 和 1301 cm⁻¹，但可以看到其此兩峰的比例在各自圖譜上其分配不完全相同。1457-1485 cm⁻¹ 區域則是以 KM18 有較清楚的兩峰，NK5 則僅有一峰，至 Ed2 則峰不明顯。在此我們先初步以光譜比較，並且探討其型式上差異，緊接著本研究將根據其特徵峰的強度進行探討。

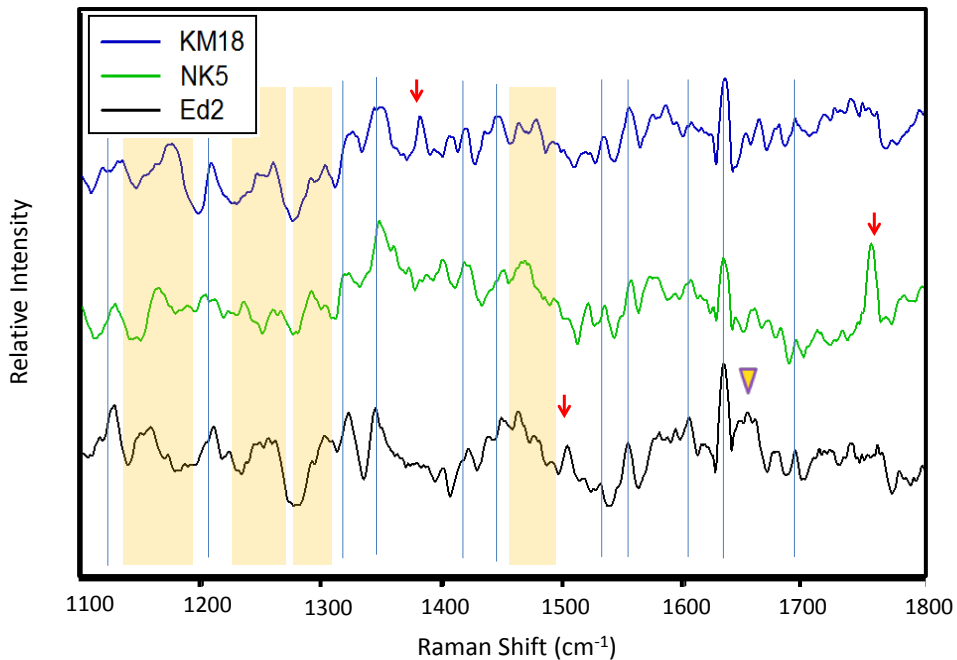


圖 3- 14 Ed2、NK5、KM18 於 1100 -1800 cm^{-1} 區域之拉曼光譜

特徵峰強度探討

本研究將其圖譜改為以區域方式呈現，以利於其特徵峰的強度比較。先前提過，由於其生化組成成分相似度極高，但其所含的比例會因其特色而有所不同，於是在此我們將其特徵峰進行強度的比較。我們將其剛剛標示出的特徵峰進行強度比較，由於利用 1048 cm^{-1} 處進行標準化，所以三株菌在此特徵峰上強度皆會為 100，在此部分將不討論此峰強度。另外有些許的特徵峰其強度落差並不明顯(圖 3- 15)，如： 453 cm^{-1} 處。其餘像是在 485 cm^{-1} 處，此峰的強度，則明顯的是 $\text{NK5} > \text{KM18} > \text{Ed2}$ ；在 596 、 618 、 680 、 897 和 954 cm^{-1} 處， $\text{KM18} > \text{NK5} > \text{Ed2}$ ；於 781 cm^{-1} 處， $\text{NK5} > \text{Ed2} > \text{KM18}$ ； 1002 cm^{-1} 強度則以 $\text{Ed2} > \text{KM18} > \text{NK5}$ 。後半段圖譜則以如圖 3- 16 所示，在 1126 、 1205 、 1502 、 1603 cm^{-1} 處， $\text{Ed2} > \text{NK5} > \text{KM18}$ ； 1379 cm^{-1} ， $\text{KM18} > \text{NK5} = \text{Ed2}$ ； 1418 cm^{-1} ， $\text{NK5} > \text{KM18} > \text{Ed2}$ ； 1555 cm^{-1} ， $\text{KM18} = \text{NK5} > \text{Ed2}$ ； 1633 cm^{-1} ， $\text{Ed2} = \text{KM18} > \text{NK5}$ ； 1754 cm^{-1} ， $\text{NK5} > \text{Ed2} = \text{KM18}$ 。

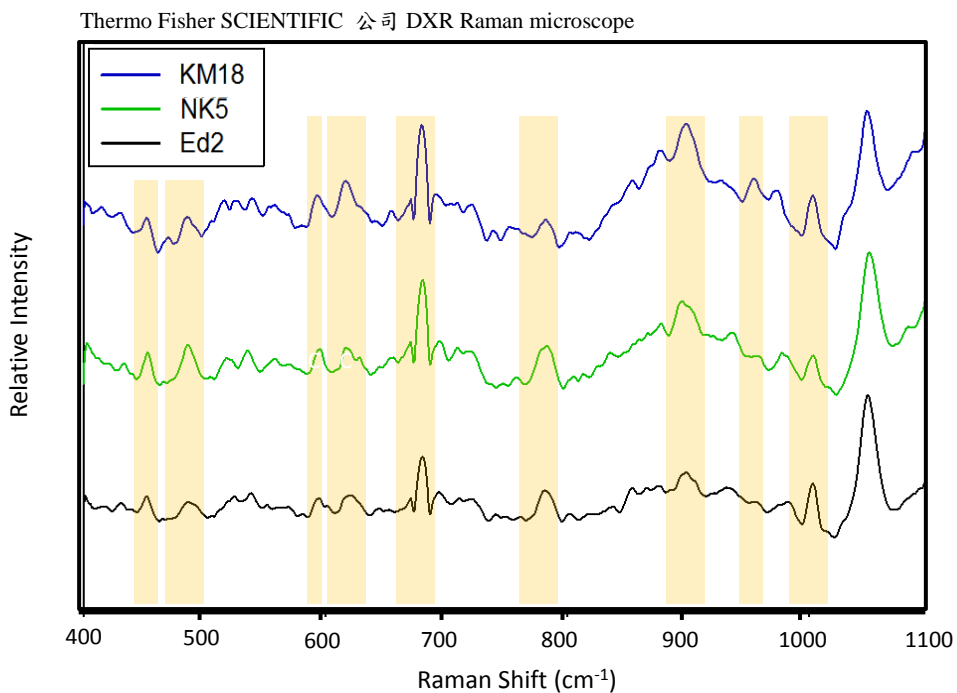


圖 3- 15 Ed2、NK5、KM18 於 400-1100 cm⁻¹ 區域之拉曼光譜

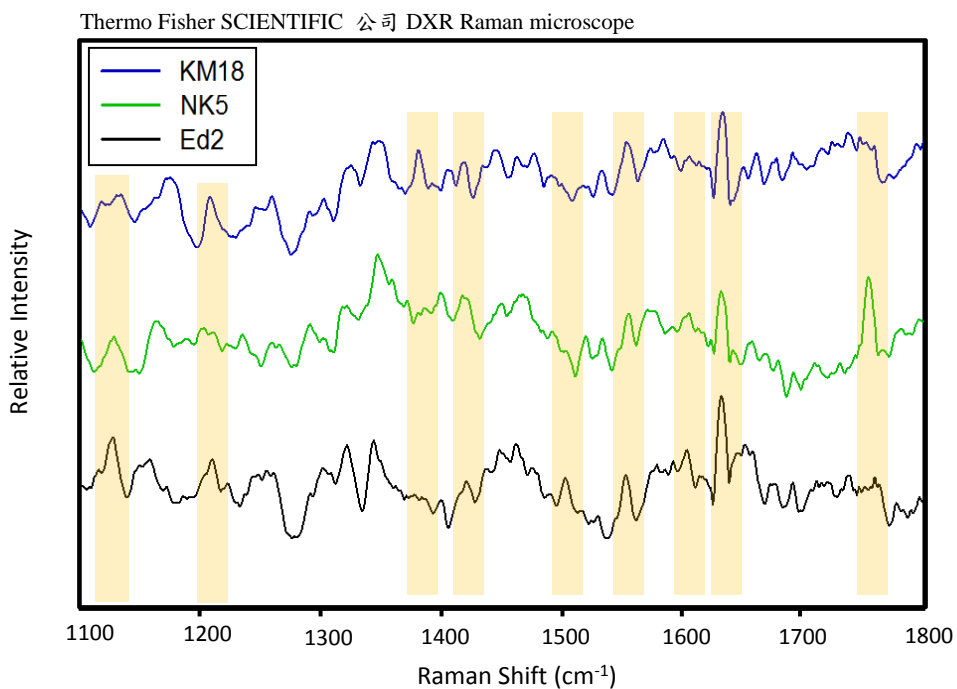


圖 3- 16 Ed2、NK5、KM18 於 1100 -1800 cm⁻¹ 區域之拉曼光譜

官能基種類探討

在此將由官能基的種類進行進一步的探討，於圖譜中的 485 cm^{-1} 為碳水化合物中的 D-甘露糖； 541 cm^{-1} 為蛋白質中的色胺酸和 S-S； 591 cm^{-1} 為胞嘧啶； 618 cm^{-1} 為蛋白質中的 C-C 扭轉模式； 680 cm^{-1} 為的鳥嘌呤； 781 cm^{-1} 則為 DNA 的 O-P-O 對稱伸縮振動； 897 cm^{-1} 則為 DNA 中的脫氧核糖環； 974 cm^{-1} 為碳水化合物中的 D-甘露糖和 RNA 中的脫氧核糖；而 1002 cm^{-1} 則為蛋白質中的苯丙胺酸； 1048 cm^{-1} 代表了蛋白質的 C-N 鍵伸縮振動模式和碳水化合物中的 C-H 彎曲、C-O、C-C、N-乙醯基葡萄糖和 D-甘露糖，以及 DNA 的脫氧核糖。另外，僅有 KM18 有的 737 和 954 cm^{-1} 則分別代表 N-乙醯基葡萄糖和蛋白質中的 C-C 鍵伸縮振動。圖譜中僅 Ed2 沒有的特徵峰 516 和 655 cm^{-1} 的位置，則分別代表蛋白質的 S-S 鍵的伸縮振動 N-乙醯基葡萄糖和蛋白質的 C-S 鍵扭曲，然而於 453 cm^{-1} 位置的特徵峰，則尚未由文獻中找到其定義的官能基。

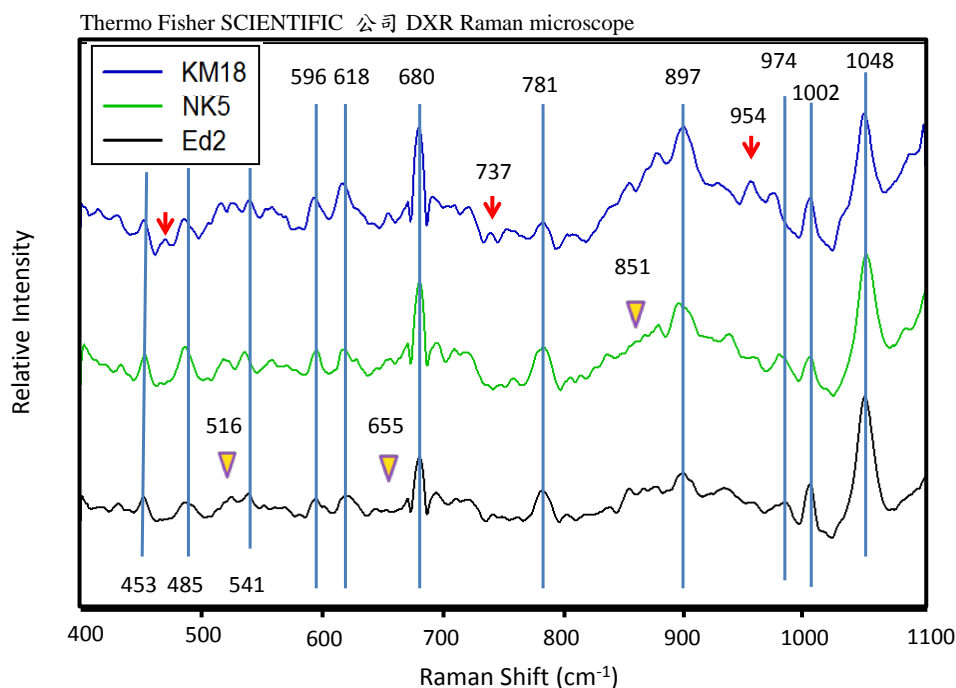


圖 3- 17 Ed2、NK5、KM18 於 $400\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ 區域之拉曼光譜

在後段光譜圖的部分， 1126 cm^{-1} 位置是屬於碳水化合物的 N-乙醯基葡萄糖和蛋白質中的反式 C-C 鍵振動的官能基；而 1205 cm^{-1} 則為蛋白質的酪胺酸及苯丙胺酸； 1320 cm^{-1} 隸屬於碳水化合物的 N-乙醯基葡萄糖、DNA 的鳥嘌呤和蛋白質的 C-C 鍵變形； 1348 cm^{-1} 為碳水化合物的 C-OH 和 D-甘露糖； 1418 cm^{-1} 則隸屬於 DNA 的鳥嘌呤和腺嘌呤； 1445 cm^{-1} 則為 DNA 的脫氧核糖； 1533 cm^{-1} 為鳥嘌呤和胞嘧啶； 1555 cm^{-1} 則為 amide II 和色胺酸的振動； 1604 cm^{-1} 則屬於苯丙胺酸和酪胺酸。其中 1379 cm^{-1} 此特徵峰僅出現於 KM18，而此訊號則代表碳水化合物中的 CH₃、N-乙醯基葡萄糖、D-甘露糖及 DNA 的腺嘌呤、鳥嘌呤和尿嘧啶。而僅於 Ed2 出現的 1502 cm^{-1} 訊號則為 DNA 中的腺嘌呤。而僅在 NK5 出現的 1754 cm^{-1} 訊號則隸屬於 C-H 鍵振動。另外在 1655 cm^{-1} 處，僅 Ed2 沒有的訊號則為蛋白質的 amide I 和顯現此蛋白質中 α -螺旋的訊號。

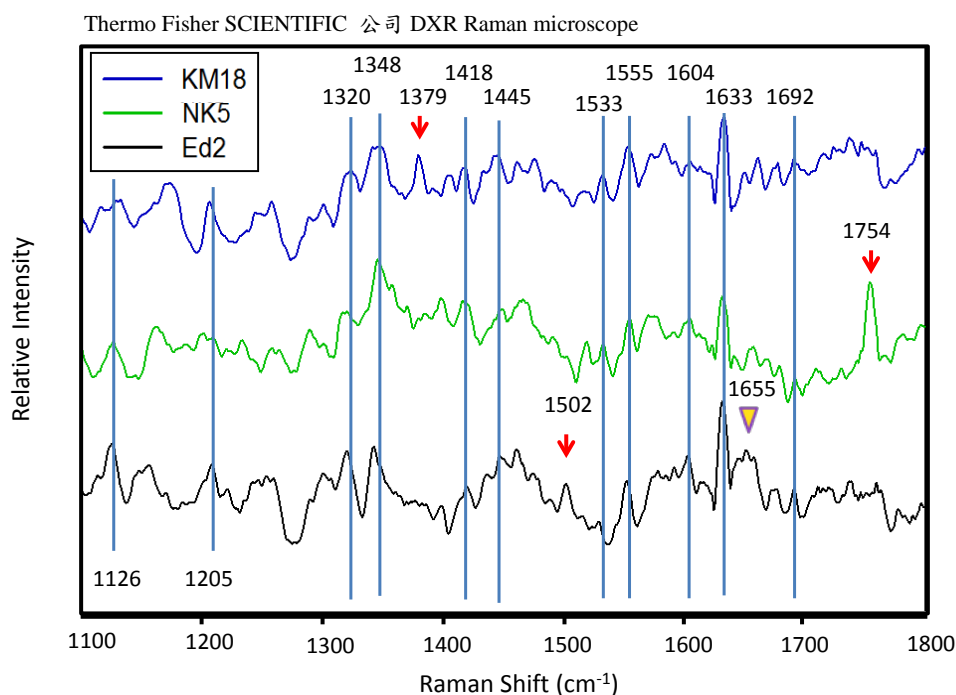


圖 3- 18 Ed2、NK5、KM18 於 $1100 - 1800\text{ cm}^{-1}$ 區域之拉曼光譜

表 3- 1 Ed2、NK5、KM18 的官能基對照和強度比較

頻率(cm^{-1})	碳水化合物	DNA/RNA	蛋白質	Ed2	NK5	KM18
453				-	-	-
485	Man			W	S	M
516	GlcNac		S-S str	W	S	M
541			S-S, Trp	W	M	W
596		C		W	M	S
618			C-C twist	W	M	S
655	C-S twist			W	M	S
680		G		W	M	S
737	GlcNac			W	W	M
781	O-P-O sym str			M	S	W
851			Tyr	S	W	M
897		r		W	M	S
954	Man		C-C str	W	M	S
974	Man			-	-	-
1002		r	Phe	S	W	M
1048	C-H 彎 曲, Man, C-O, C-C, GlcNac	r	C-N str	-	-	-
1126	Man, GlcNac	C, U	C-N str	S	M	W
1205			Tyr, Phe	S	W	M
1320	GlcNac	G	C-H def	W	W	M
1348	C-OH, GlcNac			M	W	S

表 3-2 Ed2、NK5、KM18 的官能基對照和強度比較(續)

1379	CH ₃ , Man , GlcNac	G, U, A		SS	W	W
1418		G, A		W	S	M
1445		r		-	-	-
1502		A		S	-	-
1533		G, C		W	M	M
1555	GlcNac (amide II)		amide II , Trp	W	S	S
1604			Tyr, Phe	S	M	W
1633	GlcNac (amide I)			S	W	S
1655		amide I , α -螺旋		W	M	M
1692				S	M	W
1754			C-H	W	S	W

附註：灰色區域為僅有單一細菌特有或沒有之特徵峰。

Phe-苯丙胺酸；Tyr-酪胺酸；Trp-色胺酸；Val-纈胺酸；Thr-蘇胺酸；O-P-O-磷酸；r-脫氧核糖；A-腺嘌呤；G-鳥嘌呤；C-胞嘧啶；U-尿嘧啶；Man-D-甘露糖；Glc-D-葡萄糖；GlcNac-N-乙醯基葡萄糖；str-伸縮振動；sym-對稱；asym-反對稱；def-變形。強度表示：S-強；M-中等；W-弱。

細菌特徵峰強度條碼(Barcode)

本研究亦將其圖譜的強度差異轉換為條碼(Barcode)型式，利用此形式在此輔助本研究進行不同細菌的劃分，未來或許可利用全電腦掃描的方式，將其全圖譜轉換為條碼型式，建立資料庫。由於 1100-1800 cm⁻¹ 範圍由人為去背景值，或許會造成強度差異誤差，於是本研究僅於 400-1100 cm⁻¹ 範圍挑選出 20 支特徵峰進行強度的換算，如圖 3-7。未來若是可配合軟體

進行全背景值得去除，則可建立更精密的 Barcode 型式。在此將細菌之特徵風強度換算為條碼之寬度比例，於圖 3-19 可觀察到 414、470、654、977 cm^{-1} 處差異明顯，其餘特徵峰強度也有其相對差異。

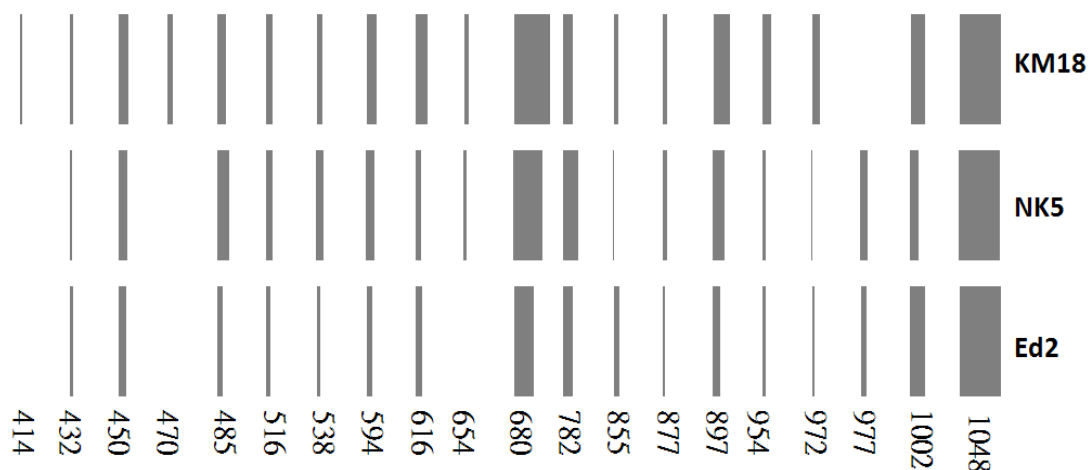


圖 3-19 特徵峰強度轉換 Barcode 型式

在此將做個小結論，由於沙門氏菌(Ed2)、鮑式不動桿菌(KM18)和克雷伯氏菌(NK5)皆為革蘭氏陰性菌，主要的結構都很相似，雖然初步比較拉曼指紋圖譜，主要的形式大致相同，然經由平均圖譜並且標準化後，比較其特徵峰強度和官能基，最為明顯的特徵峰為 680、897、1002、1048、1205、1320、1348、1555 cm^{-1} 。另外鮑式不動桿菌於 737、954、1379 cm^{-1} 的位置有別於另外二株細菌的特徵峰，這些特徵峰大部分屬於碳水化合物(N-乙酰基葡萄糖和 D-甘露糖)的官能基振動，顯示出相較於其他兩株細菌，鮑式不動桿菌可能含有較多的碳水化合物成分。而克雷伯氏菌則於 1754 cm^{-1} 有明顯異於其他兩者的特徵峰，此峰屬於蛋白質上的 C-N 振動；沙門氏菌則獨特於 1502 cm^{-1} 有明顯特徵峰，此峰屬於 DNA 中的腺嘌呤，皆顯示出其在結構上的些微差異。除此明顯差異外，亦用 Barcode 型式，更可針對全圖譜進做更細微的區分菌株。

3.1.2 噬菌體指紋圖譜比對

本研究也根據細菌所對應的噬菌體進行檢測，噬菌體是病毒的一種，對宿主細菌有著高度的專一性。由於現在細菌對抗生素的抗藥性越來越嚴重，在未來也有可能發展出以噬菌體製成的生物型試劑，所以本研究也將在以下呈現噬菌體所得圖譜和討論其官能基。

首先將先呈現以細菌 Ed2 為宿主的 ϕ L2 的指紋圖譜，依循前面方式，將先呈現其單一光譜圖(圖 3- 20)，再呈現平均的五條光譜圖(圖 3- 21)。

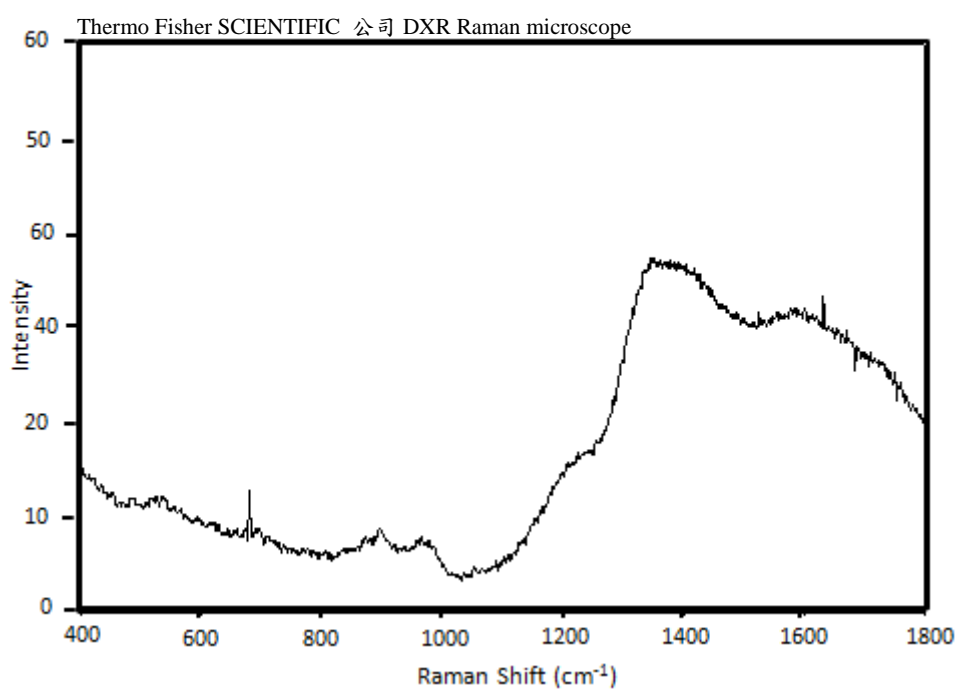


圖 3- 20 ϕ L2 的單一拉曼圖譜

Thermo Fisher SCIENTIFIC 公司 DXR Raman microscope

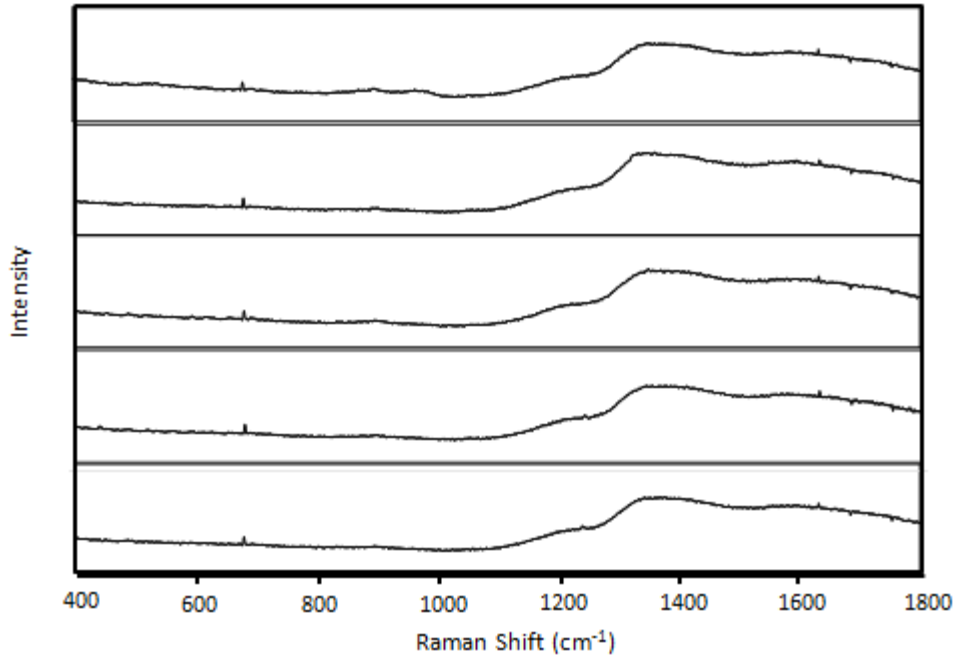


圖 3- 21 φL2 圖譜再現性特性(N=5)

Thermo Fisher SCIENTIFIC 公司 DXR Raman microscope

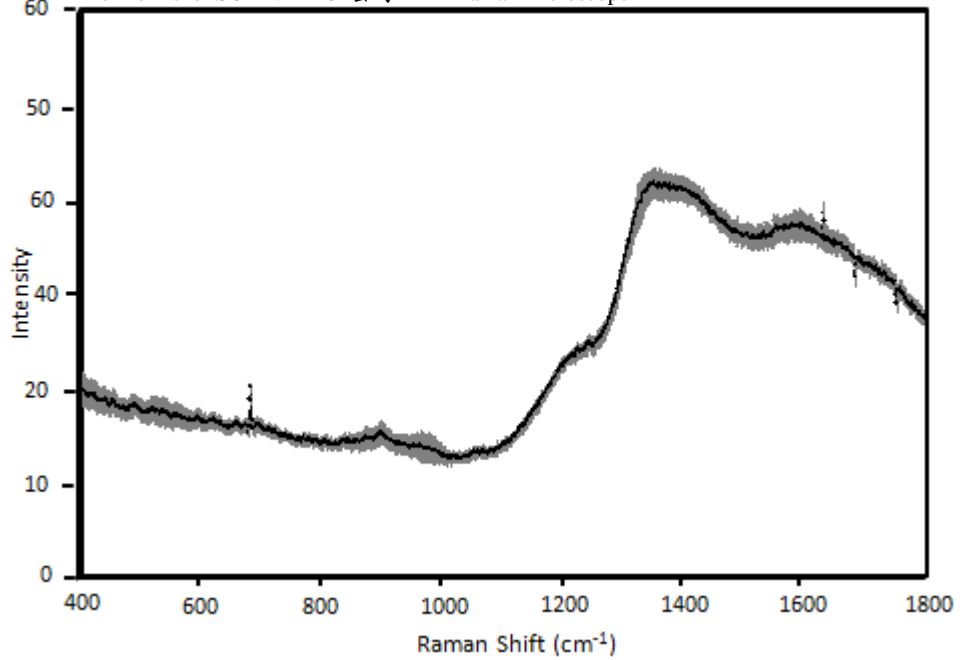


圖 3- 22 φL2 之強度標準差

緊接著，本研究亦將其所有光譜的強度以標準差和平均值的方式呈現，以表示出本次實驗的強度範圍。在此本人依舊根據其光譜的處理方式，分為 $400\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ 和 $1100\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ 兩段進行分析，並且將其組合成為圖 3-23。

圖 3-24、圖 3-25 呈現 ϕNK5 的指紋圖譜和其五條平均的光譜圖。在此亦將其光譜範圍以標準差和平均值的方式呈現，可以發現 ϕNK5 的灰色區域相較於 ϕL2 和後面將呈現的 ϕKM18 相較之下，其範圍較大。並且以同樣的方式，分開兩段圖譜，前段圖譜以軟體自動修去背景值，而後段由於螢光訊號較大，於是手動修背景值的方式消去背景值，之後再進行標準化，將圖譜中最強之特徵峰強度調整至 100，而最小強度則調整至 0。最後再將兩圖結合，呈現圖譜如圖 3-27。圖 3-28 是噬菌體 ϕKM18 的指紋圖譜，並且將逐一呈現其五條圖譜、標準差以及其最後經由處理過後的光譜圖。

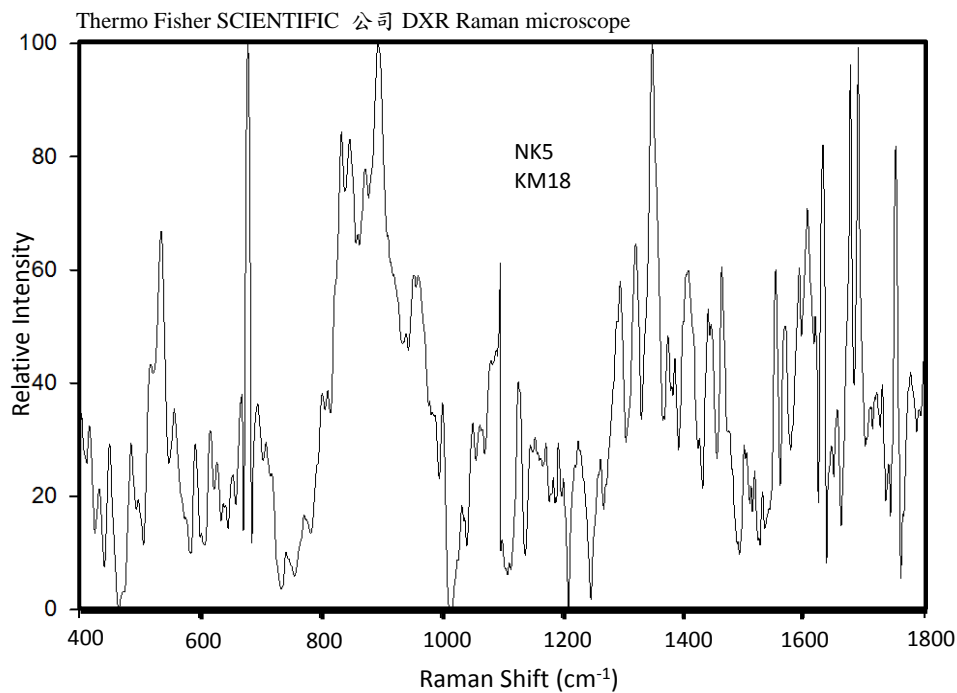


圖 3-23 ϕL2 之 $400\text{-}1100$ 及 $1100\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ 光譜組合

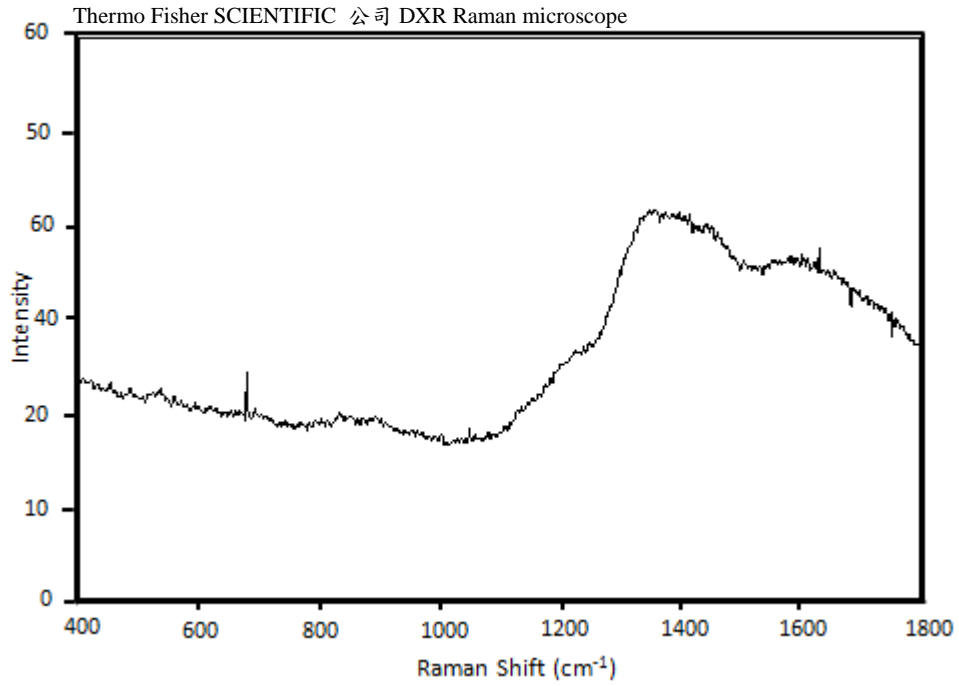


圖 3- 24 ϕ NK5 的單一拉曼圖譜

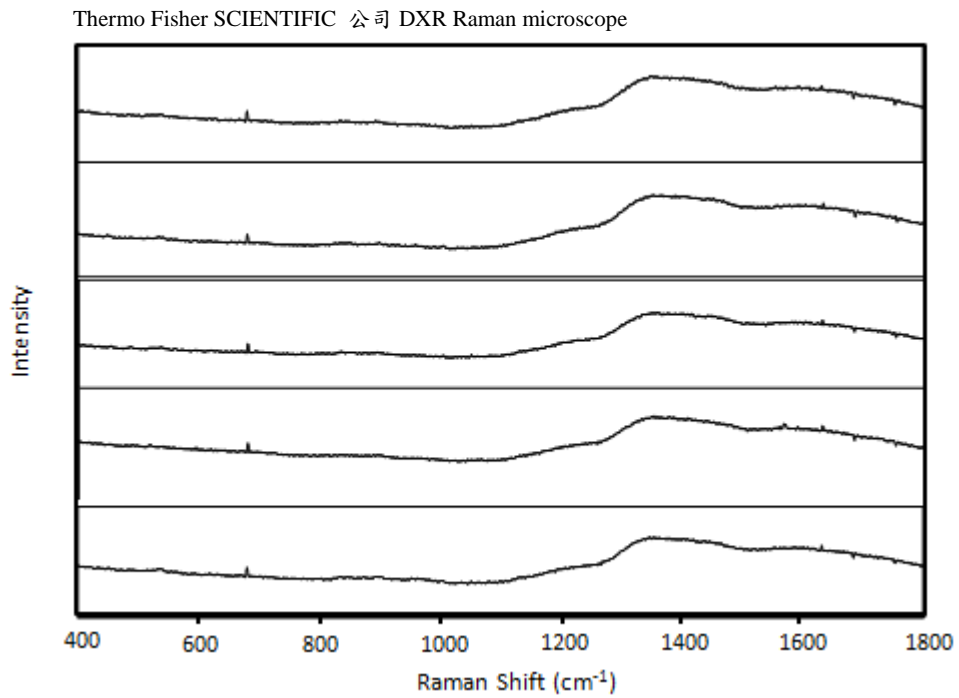


圖 3- 25 ϕ NK5 圖譜再現性特性(N=5)

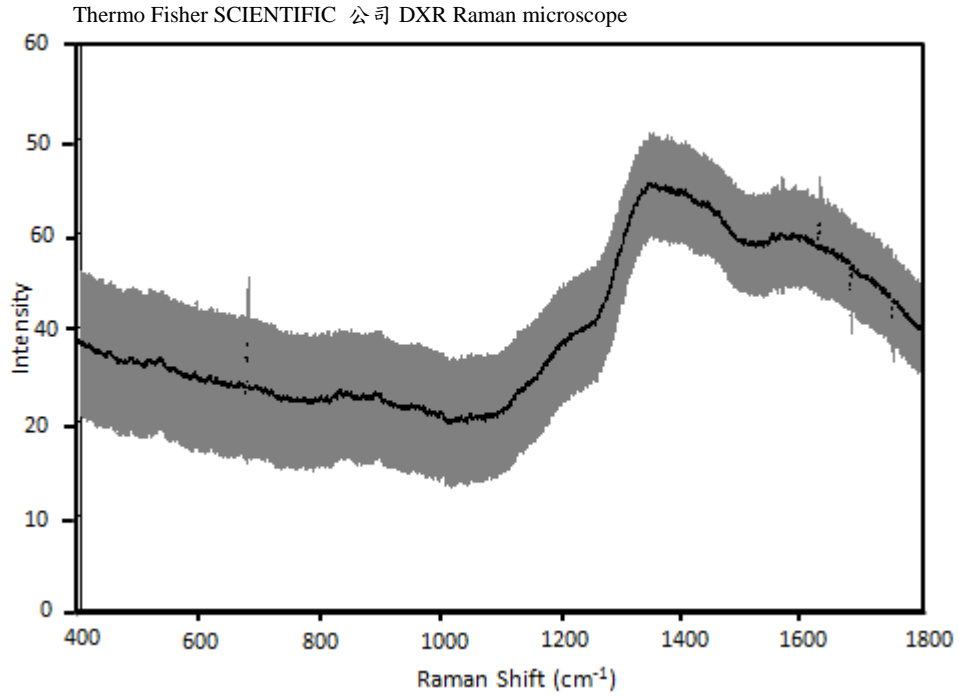


圖 3-26 ϕNK5 之強度標準差

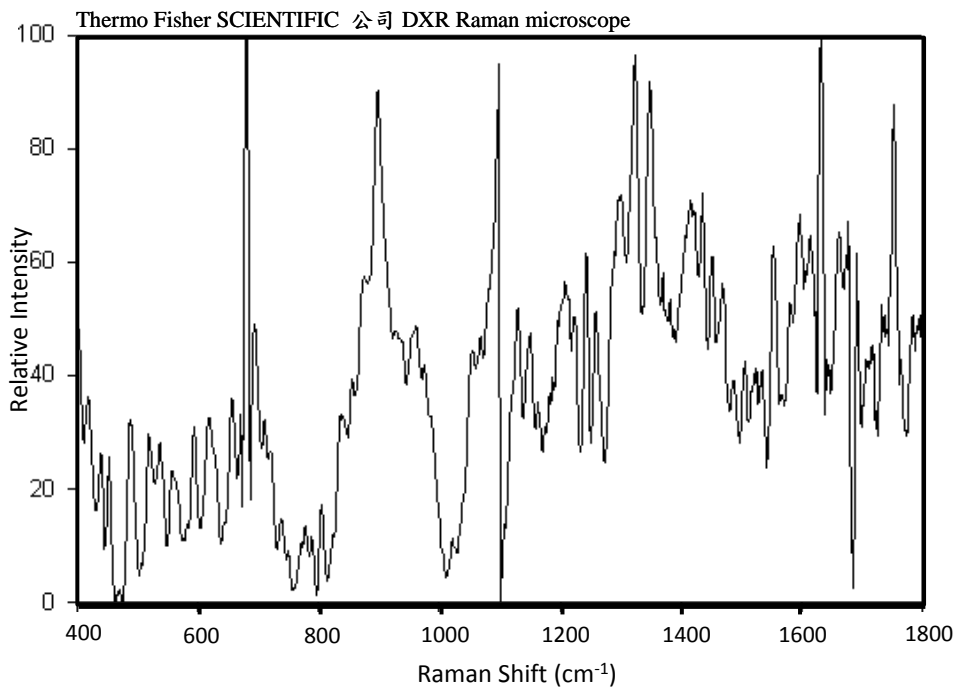


圖 3-27 ϕNK5 之 $400\text{-}1100$ 及 $1100\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ 光譜組合

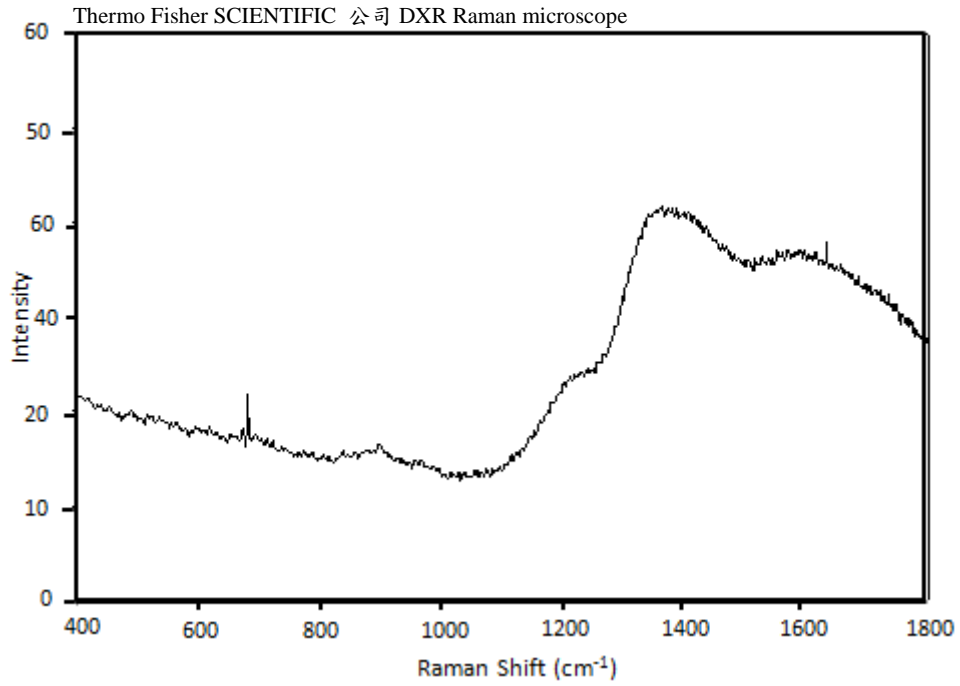


圖 3- 28 ϕ KM18 的單一拉曼圖譜

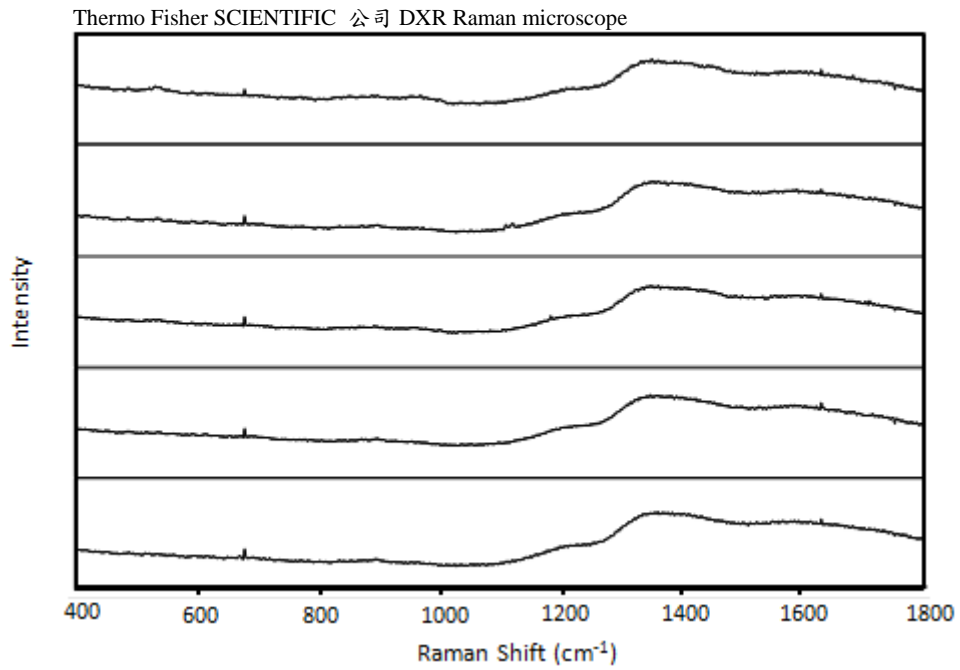


圖 3- 29 ϕ KM18 圖譜再現性特性(N=5)

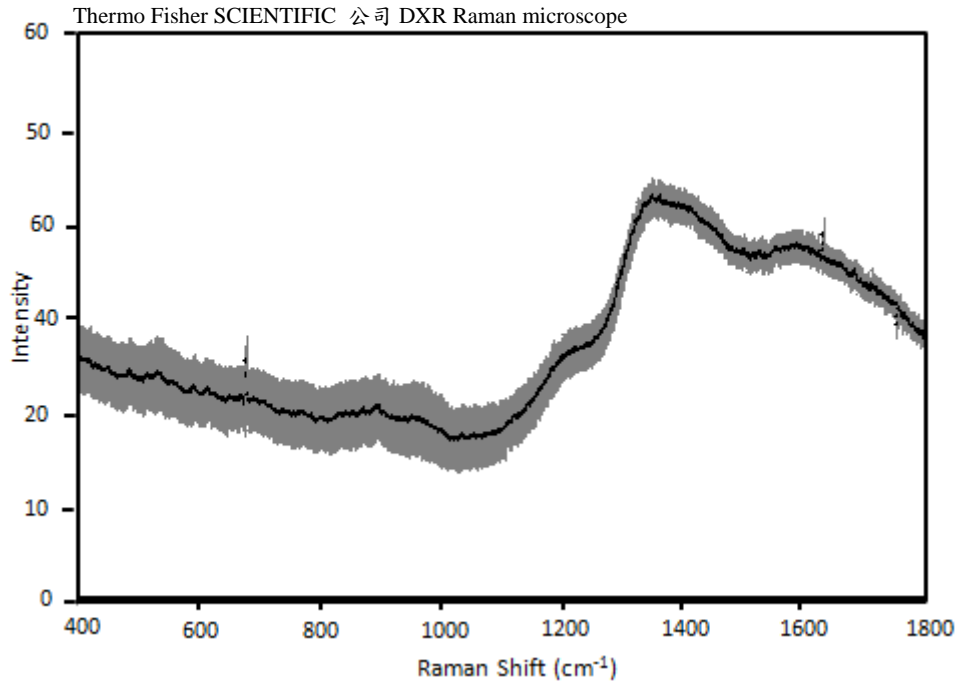


圖 3-30 ϕ KM18 之強度標準差

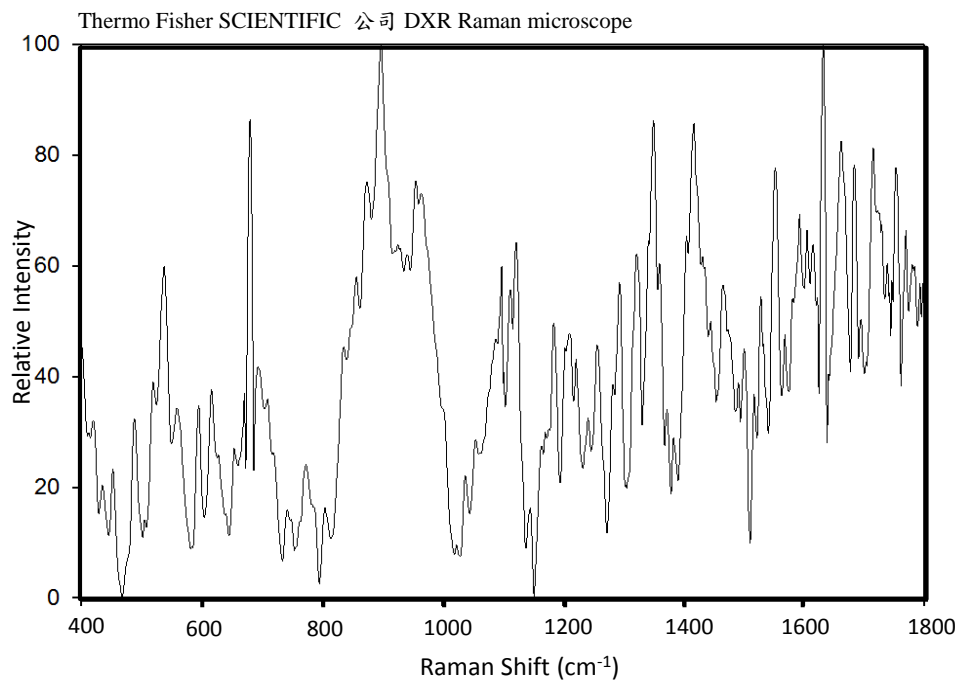


圖 3-31 ϕ KM18 之 400-1100 及 1100-1800 cm^{-1} 光譜組合

本研究將噬菌體光譜圖加以疊加以討論細菌光譜指紋圖譜模式，並根據圖譜特徵峰位置、特徵峰強度和定義官能基的種類進行比較和探討。

特徵峰比較

首先針對三株噬菌體的光譜進行初步的指紋圖譜比對，透過其特徵峰的形式不同，才能再更進一步的定義其官能基。誠如之前的記號作為不同的意義標示，其藍色直線表示三株菌皆有的特徵峰；紅色箭號表示為僅此株菌有的特徵峰，另外兩株沒有；黃色三角表示其於兩株菌皆有，僅有此株菌沒有的特徵峰；橘色陰影區域則表示為此區域分別有所差異。而在此藍色為 ϕ KM18，綠色為 ϕ NK5 和黑色的 ϕ L2。

比較圖譜，可發現於 1002 cm^{-1} 的位置，僅有 ϕ NK 有明顯的特徵峰，其餘皆未表現出來訊號。而在 1037 cm^{-1} 處，在 ϕ KM18 及 ϕ NK5 的圖譜上，皆有特徵峰存在，然僅有 ϕ L2 未顯示出。剩下的於 435 、 453 、 488 、 519 、 537 、 559 、 596 、 616 、 657 、 680 、 803 和 835 cm^{-1} 位置其三者皆有特徵峰的出現。

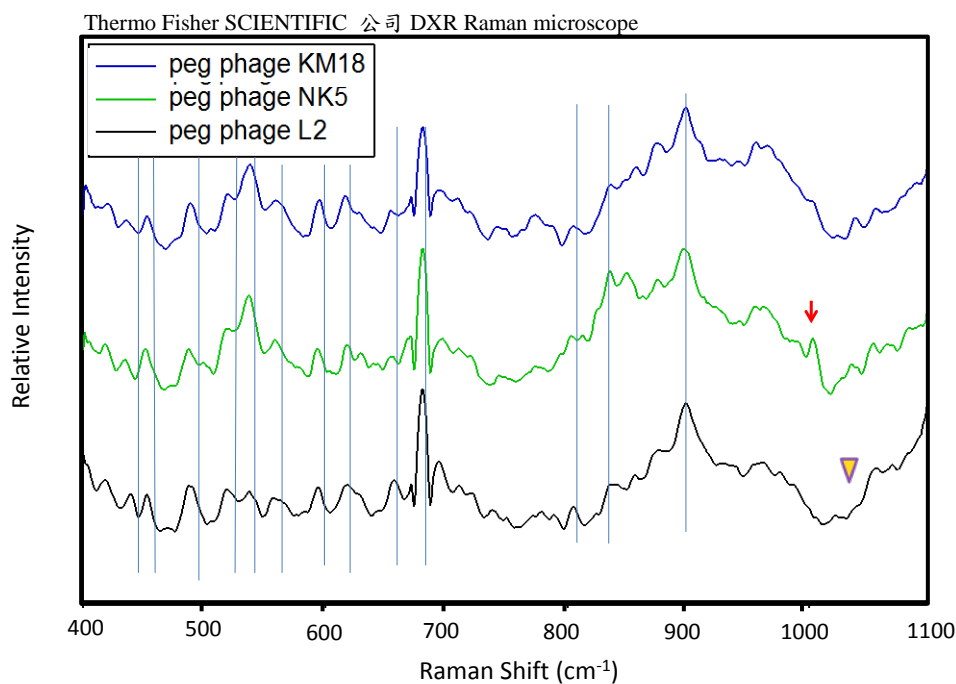


圖 3- 32 ϕ L2、 ϕ NK5、 ϕ KM18 於 $400\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ 區域之拉曼光譜

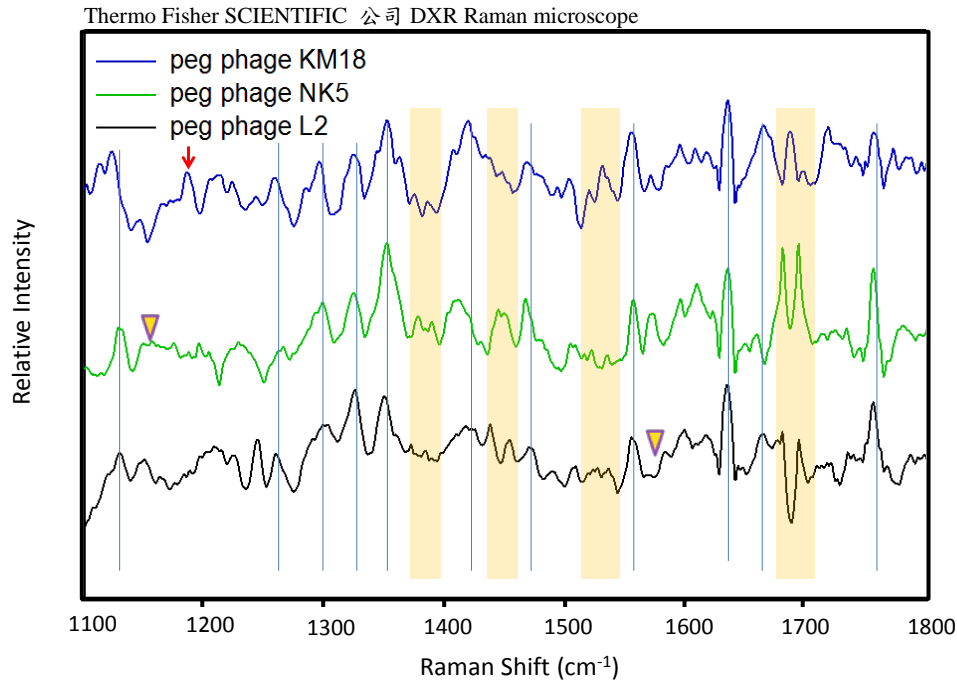


圖 3- 33 ϕ L2、 ϕ NK5、 ϕ KM18 於 1100 -1800 cm⁻¹ 區域之拉曼光譜

於後段圖譜部分， ϕ L2 和 ϕ KM18 在 1145 cm⁻¹ 皆有特徵峰，然僅於 ϕ NK5 沒有；而 1184 cm⁻¹ 處的特徵峰而是只於 ϕ KM18 的圖譜中出現；1570 cm⁻¹ 則是在僅出現於 ϕ L2 的光譜中。在橘色區域的部分，於 1368-1390 cm⁻¹ 間，可看到兩支特徵峰，並在不同圖譜中則呈現不同的強度；於 1430-1455 cm⁻¹ 間，則可看到完全沒有特徵峰出現於 ϕ KM18 中，但於 ϕ NK5 則僅出現一特徵峰，而 ϕ KM18 卻有兩特徵峰，根據判斷應該為 ϕ NK5 的特徵峰原為較微弱的兩支，經過其平滑後，則合併為一特徵峰。而每個平均圖譜在 1540-1510 cm⁻¹ 部分皆有兩特徵峰，然其兩特徵峰所反映的相對強度皆不同，甚至在 ϕ NK5 中，此兩特徵峰非常的微弱；1678-1700 cm⁻¹ 部分，則亦為如此，以比例來看， ϕ KM18 呈現 3:1 而 ϕ NK5 則呈現 1:1 的比例，至於 ϕ L2 則有一特徵峰不明顯，而其餘特徵峰則皆為三者皆有，在之後會更進一步比較。

特徵峰強度探討

在此，本研究將挑出強度較明顯的區域或特徵峰進行討論，而剩下之前有提過的特徵峰，將會一併整理於後面表 3-3 中。在 537 cm^{-1} 的特徵峰，強度大小為 $\phi\text{L2} > \phi\text{NK5} > \phi\text{KM18}$ ； 657 cm^{-1} ， $\phi\text{L2} > \phi\text{NK5} = \phi\text{KM18}$ ； 803 、 896 cm^{-1} ， $\phi\text{L2} > \phi\text{KM18} > \phi\text{NK5}$ ； 1002 cm^{-1} ， $\phi\text{NK5} > \phi\text{KM18} = \phi\text{L2}$ ； 1037 cm^{-1} ， $\phi\text{NK5} = \phi\text{KM18} > \phi\text{L2}$ 。後段光譜圖中，於 1128 cm^{-1} 的圖譜中， ϕKM18 和其他相比，在此段稍有位移，位移約 3 cm^{-1} ，而強度比較則是 $\phi\text{NK5} > \phi\text{KM18} > \phi\text{L2}$ ； 1257 ， $\phi\text{L2} > \phi\text{KM18} > \phi\text{NK5}$ ； 1350 ， $\phi\text{NK5} > \phi\text{KM18} > \phi\text{L2}$ ； 1416 ， $\phi\text{KM18} > \phi\text{NK5} > \phi\text{L2}$ ； 1465 ， $\phi\text{NK5} > \phi\text{L2} > \phi\text{KM18}$ ； 1552 、 1661 ， $\phi\text{KM18} > \phi\text{NK5} > \phi\text{L2}$ 。

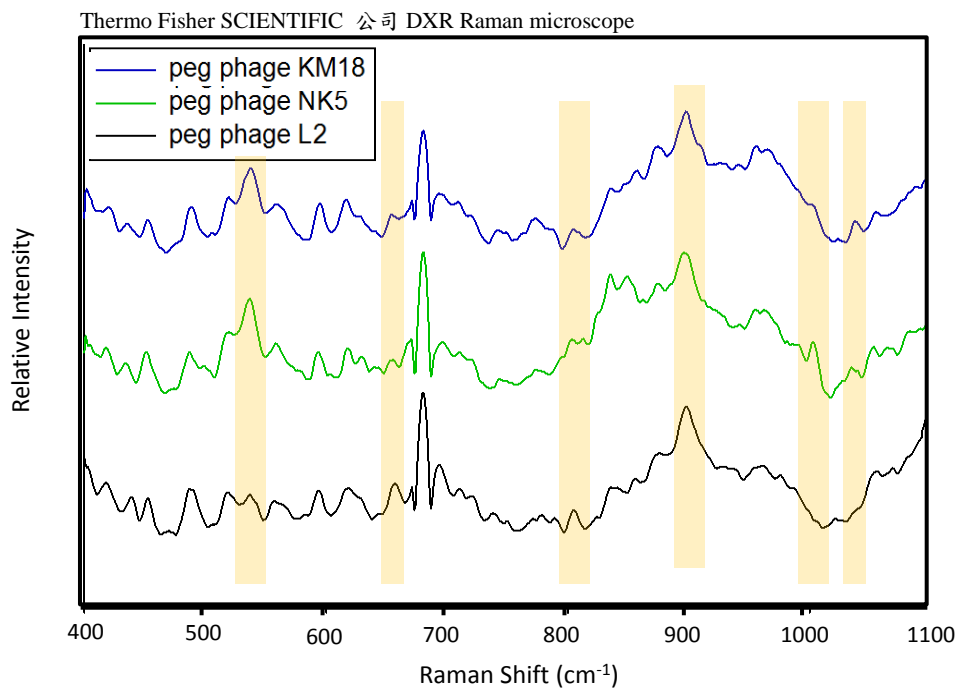


圖 3-34 ϕL2 、 ϕNK5 、 ϕKM18 於 $400\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ 區域之拉曼光譜

Thermo Fisher SCIENTIFIC 公司 DXR Raman microscope

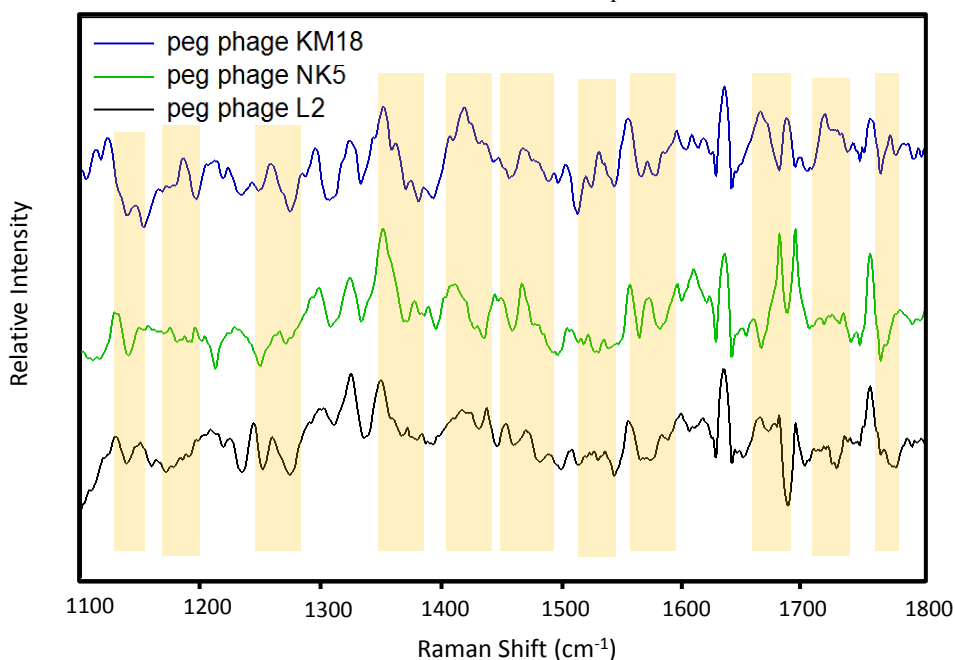


圖 3- 35 ϕ L2、 ϕ NK5、 ϕ KM18 於 1100 -1800 cm^{-1} 區域拉曼光譜

官能基種類探討

在此將針對圖譜中的特徵峰和官能基做個對照，488 cm^{-1} 為碳水化合物中的 D-甘露糖；519 cm^{-1} 隸屬於碳水化合物中的 N-乙醯基葡萄糖和蛋白質中的 S-S 鍵的伸縮振動；537 cm^{-1} 則為蛋白質中的 S-S 鍵和色胺酸；596 cm^{-1} 則為 RNA 中的胞嘧啶；616 cm^{-1} 則為蛋白質中的 C-C 鍵旋轉；657 cm^{-1} 則為碳水化合物中的 C-S 鍵旋轉；680 cm^{-1} 隸屬於 RNA 中的鳥嘌呤；835 cm^{-1} 為碳水化合物中的 D-甘露糖和酪胺酸和纈氨酸；而 896 cm^{-1} 為 DNA 中的脫氧核糖環；1002 cm^{-1} 屬於 RNA 中的脫氧核糖環和蛋白質的苯丙胺酸；1037 cm^{-1} 為蛋白質中苯丙胺酸的 C-H 鍵振動訊號。

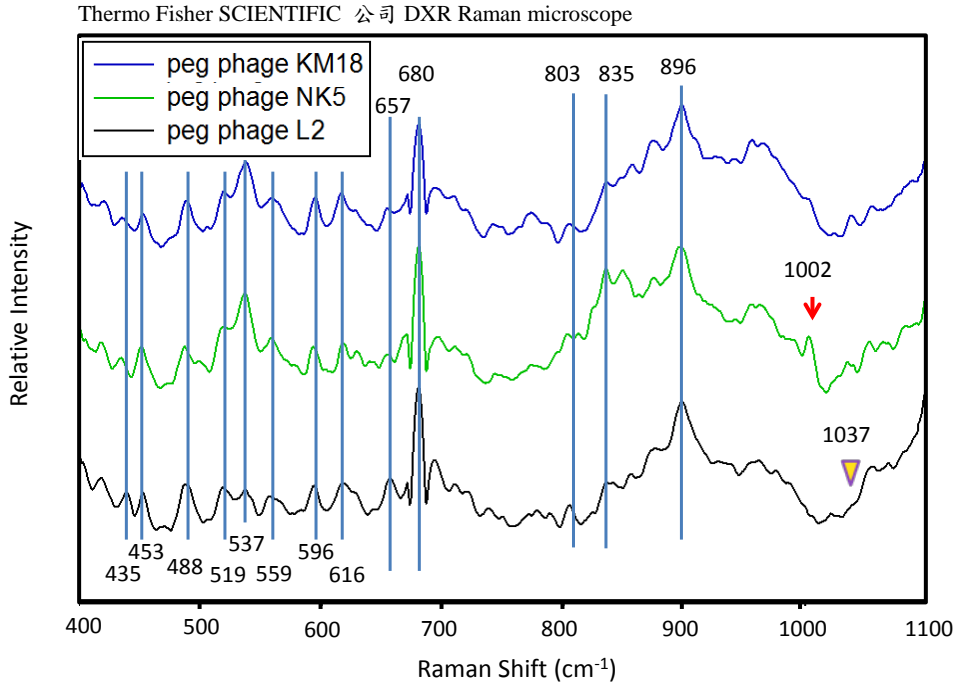


圖 3- 36 ϕ L2、 ϕ NK5、 ϕ KM18 於 $400\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ 區域之拉曼光譜

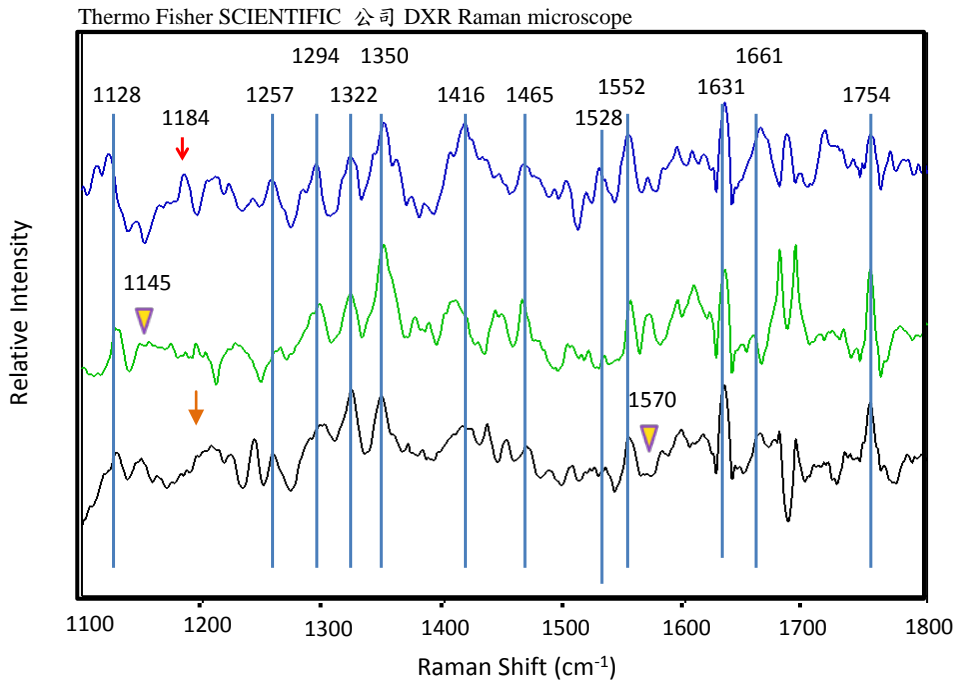


圖 3- 37 ϕ L2、 ϕ NK5、 ϕ KM18 於 $1100\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ 區域拉曼光譜

後段圖譜中， 1128 cm^{-1} 為碳水化合物中的 D-甘露糖、N-乙醯基葡萄糖及 RNA 中的胞嘧啶和尿嘧啶，以及蛋白質中的 C-N 鍵的伸縮共振； 1257 cm^{-1} 則為 RNA 中的鳥嘌呤和腺嘌呤； 1294 cm^{-1} 為脂質 C-H 鍵； 1322 cm^{-1} 為 N-乙醯基葡萄糖和 RNA 中的鳥嘌呤以及蛋白質中的 C-H 鍵變形； 1350 cm^{-1} 隸屬於碳水化合物中的 N-乙醯基葡萄糖和 C-OH 鍵； 1416 cm^{-1} 則為鳥嘌呤和腺嘌呤之訊號； 1465 cm^{-1} 則為 RNA 中的脫氧核糖； 1552 cm^{-1} 為 N-乙醯基葡萄糖中的 amide II 和蛋白質中的色胺酸； 1631 cm^{-1} 則為碳水化合物中的 amide I； 1661 cm^{-1} 為 RNA 中的 C=O 鍵、鳥嘌呤、胞嘧啶及尿嘧啶； 1754 cm^{-1} 為蛋白質中的 C-H 鍵。另外各光譜獨自擁有的特徵峰，如；僅 ϕKM18 有的 1184 cm^{-1} 則代表著蛋白質中的 C-N 鍵振動； 1240 cm^{-1} 處則有 amide III 之明顯官能基； 1528 cm^{-1} 為 RNA 中的胞嘧啶。僅獨自一株噬菌體所沒有的訊號：如 1570 cm^{-1} 屬於腺嘌呤和鳥嘌呤之訊號。其他如 435 、 453 、 559 、 803 及 1145 cm^{-1} 則仍有待進一步確認定義這些特徵峰的文獻。

表 3-4 ϕ L2、 ϕ NK5、 ϕ KM18 的官能基對照和強度比較

頻率(cm^{-1})	碳水化合物	DNA/RNA	蛋白質	Ed2	NK5	KM18
435						
453				M	M	S
488	Man			S	W	M
519	GlcNac		S-S str	W	W	M
537			S-S, Trp	S	M	W
559						
596		C				
616			C-C twist			
657	C-S twist			S	W	W
680		G				
803				S	M	W
835	Man		Tyr, Val	M	S	W
896		r				
1002		r	Phe		S	
1037			Phe(C-H)		W	W
1128	Man, GlcNac	C, U	C-N str	W	S	M
1145	Man, GlcNac	r				
1184			C-N	W	W	S
1257		C, A	amide III(無規 捲曲)	S	W	M
1322	GlcNac	G	C-H def	W	S	M
1340			amide III	W		S

表 3- 5 ϕ L2、 ϕ NK5、 ϕ KM18 的官能基對照和強度比較(續)

1350	C-OH, GlcNac			W	S	M
1416		G, A		W	S	M
1465		r		M	S	W
1528		C		W	W	S
1552	GlcNac (amide II)		amide II, Trp	W	M	S
1570		A, G		W	S	M
1631	GlcNac (amide I)					
1661		C=O str, U, G, C	amide I	M	W	S
1754			C-H	M	S	W

附註：灰色區域為僅有單一細菌特有或沒有之特徵峰。

Phe- 苯丙胺酸；Tyr- 酪胺酸；Trp- 色胺酸；Val- 纈胺酸；Thr- 蘇胺酸；O-P-O- 磷酸；r- 脫氧核糖；A- 腺嘌呤；G- 鳥嘌呤；C- 胞嘧啶；U- 尿嘧啶；Man-D- 甘露糖；Glc-D- 葡萄糖；GlcNac-N- 乙醯基葡萄糖；str- 伸縮振動；sym- 對稱；asym- 反對稱；def- 變形。強度表示：S- 強；M- 中等；W- 弱。

噬菌體特徵峰強度條碼(Barcode)

在此亦於噬菌體圖譜中 $400-1100\text{ cm}^{-1}$ 範圍取 20 支特徵峰，將其強度轉為條碼(Barcode)型式。可由圖 3- 38 證明於 848 、 873 、 1002 、 1036 cm^{-1} 等特徵峰的強度有明顯差異，甚至為僅有其中一噬菌體有或僅有其中一噬菌體沒有特徵峰，其他特徵峰之強度也皆有相對差異。

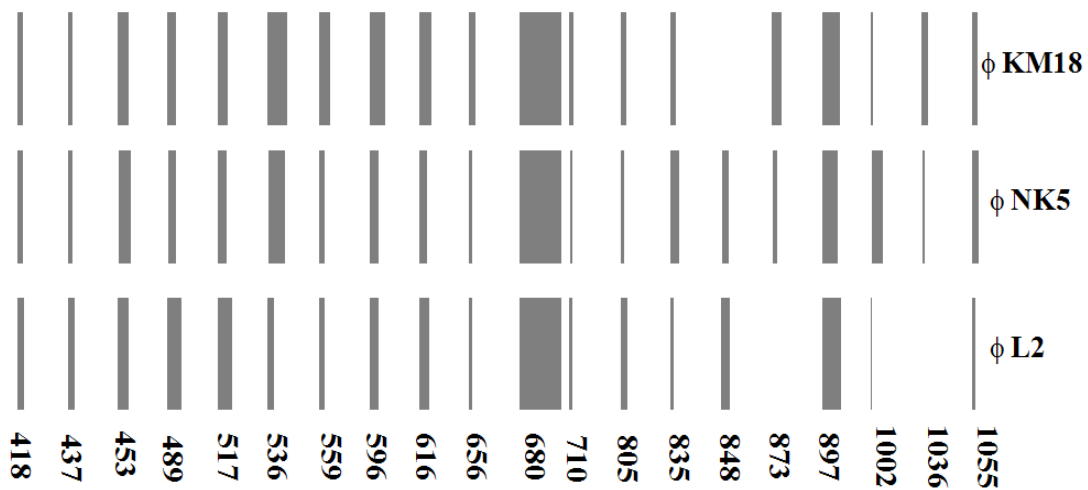


圖 3-38 特徵峰強度轉換 Barcode 型式

綜觀整個圖譜，特徵峰的顯現與細菌不同。三株噬菌體皆於 488、537、680、896、1128、1322、1350、1631、1754 cm^{-1} 位置有明顯特徵峰。然噬菌體 ϕKM18 於 1184 cm^{-1} 處有一特殊特徵峰是 ϕNK5 和 ϕL2 所沒有的，但尚未有其所對應的官能基的資訊；於 1002 cm^{-1} 處苯丙胺酸是僅為 ϕNK5 所有，而 1145 cm^{-1} 則是僅 ϕNK5 所沒有；而 ϕL2 則是於 1037、1240 和 1570 cm^{-1} 處無此特徵峰，其餘噬菌體皆有，而這些特徵峰則分別代表 DNA 和蛋白質；在 1240 cm^{-1} 則有相較於其他噬菌體之明顯特徵峰，此屬於 amide III 之胺基酸官能基。這也表示出其結構上可能的不同。最後，同樣的以 Barcode 型式進行區分。

3.1.3 拉曼系統比較

除此之外，亦將 Thermo Fisher SCIENTIFIC 公司的桌上型 DXR Raman microscope (在此簡稱桌上型拉曼系統)所得圖譜與 BWTEK 公司可攜式 i-Raman 系統所得光譜圖(簡稱可攜式拉曼系統)。在此比較此兩種機型，則是期望於若是可攜式拉曼系統所得之光譜訊號和桌上型系統相似，則可更進一步推廣於一般診間，以及其普遍性的可能性則將會增加。其結果，成大的拉曼系統其解析度為 1 cm^{-1} ，而本實驗室的拉曼系統則約為 3 cm^{-1} 。在此則舉 KM18 為例，進行比較，另外兩株細菌圖譜比較則置於附錄中。由圖譜對照可發現，其明顯的特徵峰兩者皆有，因圖譜收集訊號的方式不，如可攜式拉曼系統所讀取的訊號會隨著時間累計，而桌上型拉曼系統則會以訊號的強弱進行壓縮或放大的現象，造成其特徵峰的強弱比例差異的問題，此現象於後段頻譜中更為明顯。若是以對照其官能基的功能而言，兩套系統則皆可行。

在此同樣舉 ϕ KM18 為例，其於圖譜將置於附錄中。圖 3-40 是桌上型拉曼系統與可攜式拉曼系統的噬菌體圖譜比較，可以發現同樣的問題，可攜式拉曼系統的光譜圖所呈現的特徵峰強度上差異程度，並沒有如桌上型拉曼系統如此分明。不過在其官能基的對照上，並沒有太大的差異。

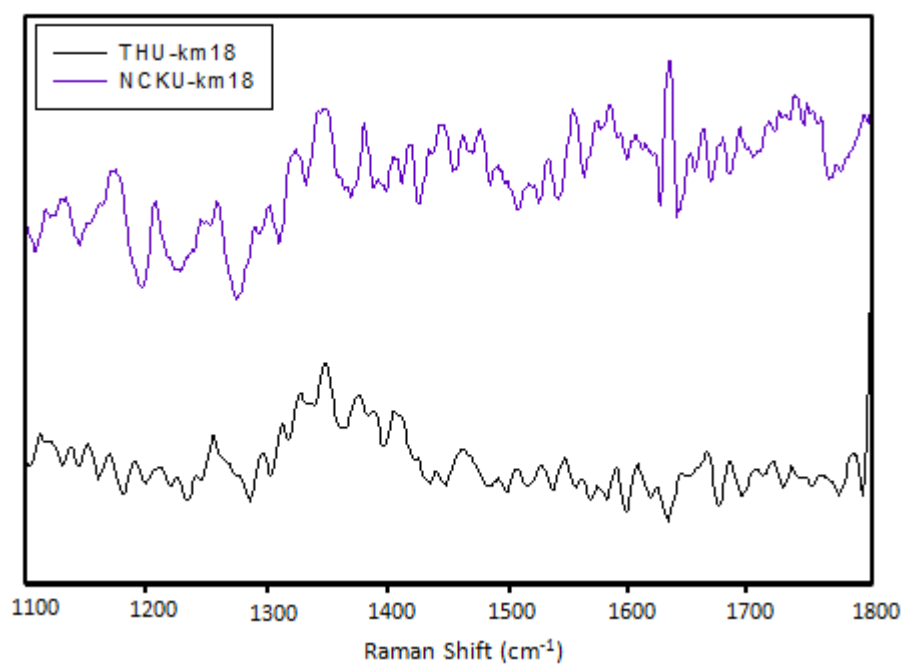
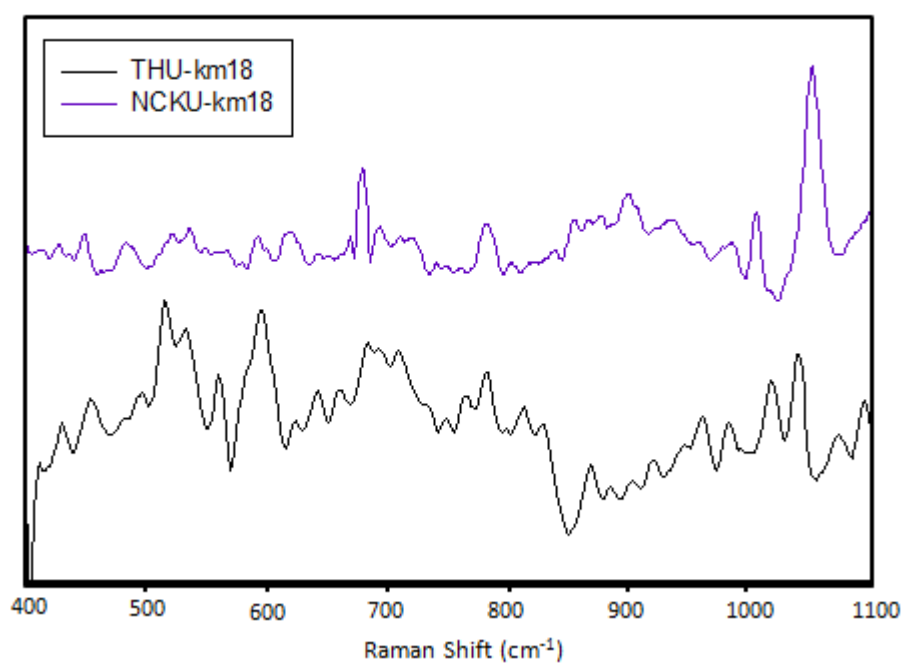


圖 3-39 桌上型拉曼系統與可攜式拉曼系統之細菌(KM18)圖譜比較

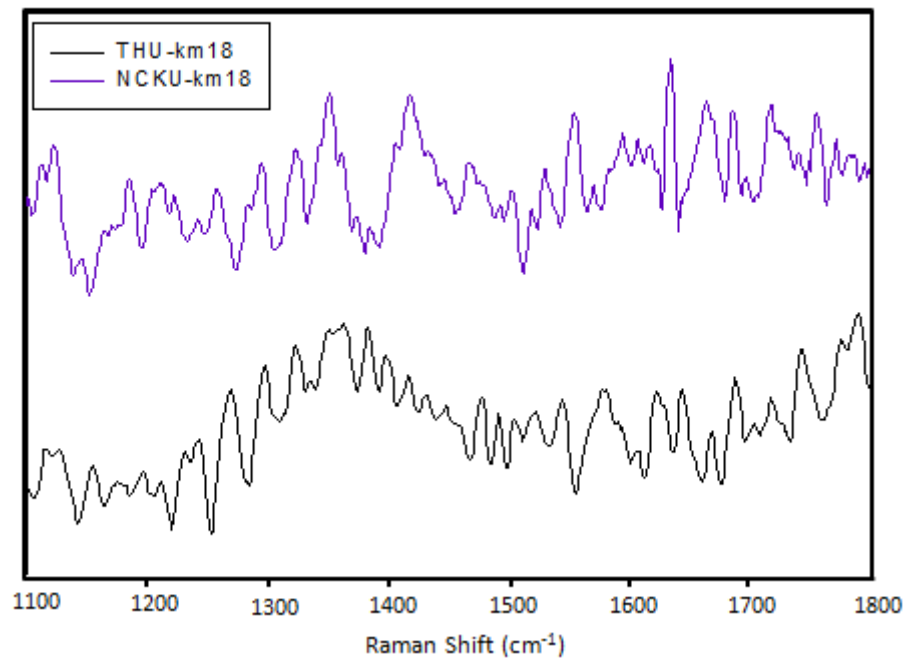
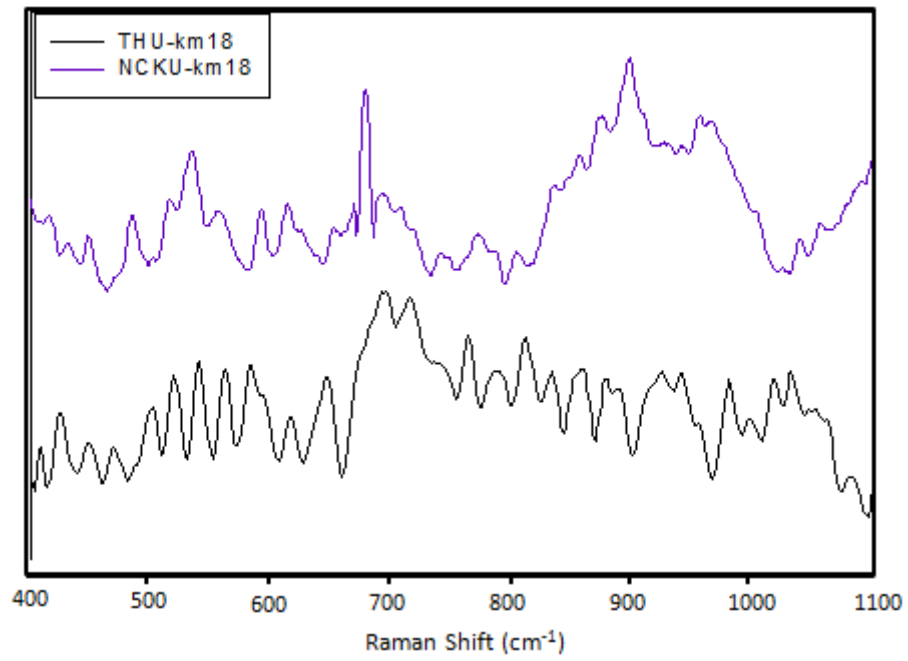


圖 3-40 桌上型拉曼系統與可攜式拉曼系統之噬菌體(ϕ KM18)圖譜比較

由於光路、軟體、系統解析度和環境中溫度調控的不同等原因，皆有可能造成兩系統的結果誤差。在此本研究亦由兩系統挑選出 31 支明顯的特徵峰，對照其重複之特徵峰(22 支)，發現以高階桌上型為基準，可攜式系統之訊號相似度約為 68%。儘管兩系統可提供之資訊有比率的差異，但是若是加以定位其所能利用的位置，則仍能發揮其功效。此外，本研究亦將於其重複之特徵峰進行 Barcode 模式換算，呈現於圖 3-41。另外，並將其相對差異度換算成百分比，統計於圖 3-42。

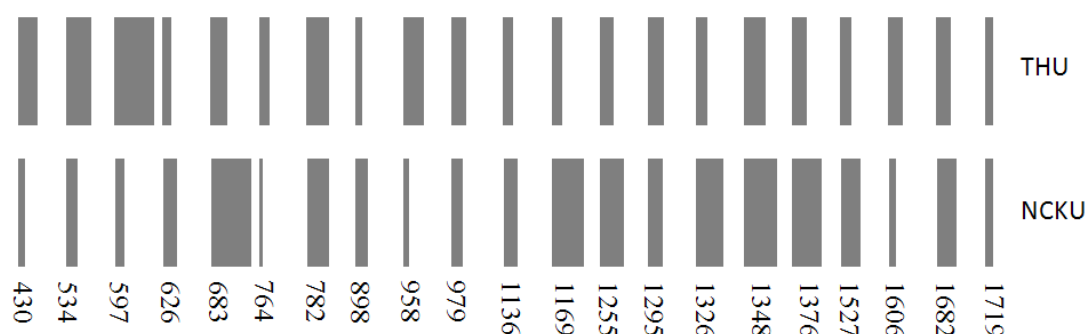


圖 3-41 可攜式系統與桌上型系統之 Barcode 模式

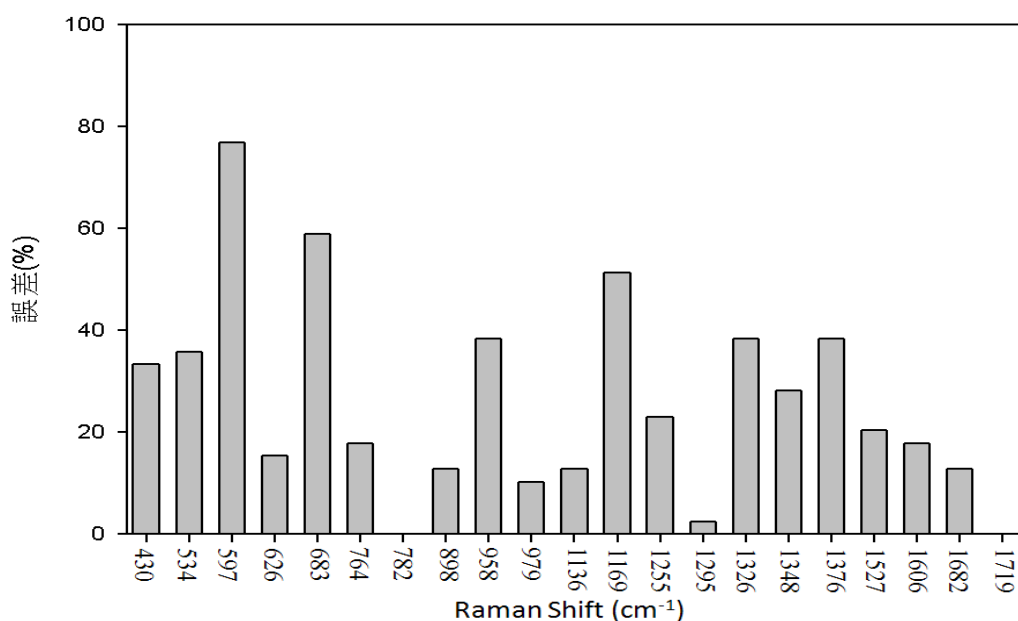


圖 3-42 重複特徵峰之誤差值

3.2 *A. baumannii* 圖譜表現

本研究也和義守大學化工系 洪志勳老師合作，取得10株*Acinetobacter baumannii*菌株，此10株菌株則分別取自於不同的來源，以及各自有著抵抗不同藥物的能力。另外，加上由洪老師實驗室所提供一株抗噬菌體菌株R3為KM18之突變菌株，共有12株*Acinetobacter baumannii*菌株進行比較，在此呈現以桌上型拉曼系統檢測並將同前面方式，進行分析。

圖譜特徵峰比較和官能基種類探討

首先，根據其整體指紋圖譜進行比較，於453、485、594、619、680、754、782、900、1002及1048 cm^{-1} 的位置，皆有明顯特徵峰，於513-546 cm^{-1} 處則區域變化明顯有差異。然而亦可明顯看出，不同的菌株，其具有其特定的差異。而這些位置的特徵峰則代表以下官能基：485 cm^{-1} 代表碳水化合物中的D-甘露糖；594 cm^{-1} 則為胞嘧啶；619 cm^{-1} 隸屬於蛋白質中的C-C鍵振動；680 cm^{-1} 為鳥嘌呤；754為DNA中的胸腺嘧啶及蛋白質中的色胺酸；782 cm^{-1} 則為DNA中的O-P-O伸縮振動；900 cm^{-1} 為蛋白質中的C-C鍵振動；1002及1048 cm^{-1} 則分別為苯丙胺酸及蛋白質的C-N鍵伸縮振動模式和碳水化合物中的C-H彎曲、C-O、C-C、N-乙醯基葡萄糖和D-甘露糖。緊接著，本研究將針對其對藥物抗藥性進行探討。

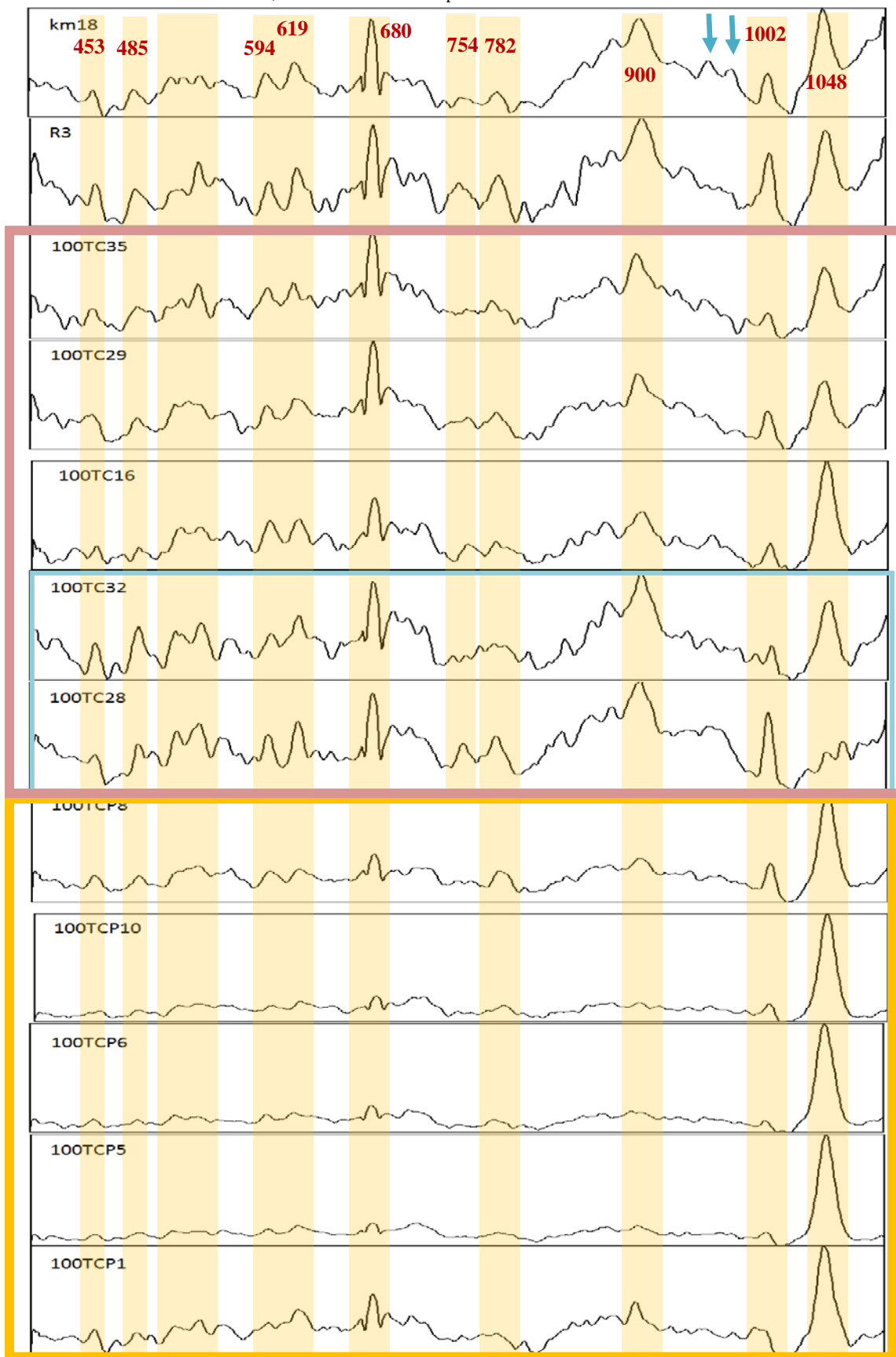


圖 3- 43 A. baumannii 圖譜表現(400-1100 cm^{-1})

抗藥性探討

由於目前尚未釐清其每種抗生素與此菌株的作用，僅能先以指紋圖譜和其抗藥機率和種類進行劃分並分析。目前僅知R3為KM18之突變種，在此並無原菌株KM18和R3的抗藥程度資訊，所以並無法將其劃分與分析。

首先，針對其 10 株菌的抗藥機率進行劃分，根據義守大學化工系 洪志勳給予的資料，1、5、6、8、10(在此以菌株編號數字代表)對其 18 種抗生素中，僅特定一種抗生素(colistin)對其有效，平均抗藥性高達 95%，在此亦將其圖譜以黃框劃分為群組。而另一群組則以 16、28、29、32、35 為主，針對此 18 種抗生素而言，此組抗藥性平均為 39%，所以歸類其為一組。透過圖譜可發現低抗藥性組的圖譜整體起伏較明顯；而高抗藥性組的圖譜則相較之下起伏微弱許多，僅在 1048 cm^{-1} 的位置有非常明顯的特徵峰。研判是由於標準化，將其最大波峰調整為 100，由於高抗藥性組本身 1048 cm^{-1} 特徵風之強度比例和其他特徵峰比例差異就極大，在經過標準化後，就更為明顯，因此在高抗藥性組中的菌株，研判可能是其細胞膜構造中蛋白質和碳水化合物的組成含量高於其低抗藥性組之細菌，使其改變通透性，使菌株本身不易被藥物攻擊。同理可證，16 的抗藥性比例雖沒高達 95%，但仍有 83%，所以亦可從其圖譜發現，於 1048 cm^{-1} 位置的特徵峰，亦明顯高於其他特徵峰。

除此之外，在低抗藥性的組別中，抗藥性最低的兩者:32 和 28，則是皆以 900 cm^{-1} 位置上的官能基強度最強，於 $513\text{-}546\text{ cm}^{-1}$ 範圍間含有二峰，而此二峰皆明顯，呈現約 1:1 的強度情形。另外，值得注意的是，編號 28 的 1048 cm^{-1} 位置上甚至無明顯特徵峰，相對於 1048 cm^{-1} 反倒是 1002 cm^{-1} 的苯丙胺酸和 DNA 中的去氧核糖之強度較其強。

而編號 35 與 29 兩株細菌，則是有相似的抵抗藥物種類，僅對一種藥物結果不同，我們可以觀察出其整體指紋圖譜的型式，可說是極為相似。

由於後段圖譜如先前所言，利用手動扣除螢光背景，所以在整體的強度而言，不如前段圖譜般明顯可比較出，但是在此我們一樣先點出其明顯的特定官能基。這些圖譜於 1128、1206、1258、1346、1552、1657、1708 及 1754 cm^{-1} 處有明顯特徵峰且於不同菌株有明顯變化。1128 cm^{-1} 所對應的官能基為 D-甘露糖、N-乙醯基葡萄糖及胞嘧啶和尿嘧啶；1206 cm^{-1} 為碳水化合物中的葡萄糖醛酸、D-葡萄糖、N-乙醯基葡萄糖；1258 cm^{-1} 為鳥嘌呤和腺嘌呤；1346 cm^{-1} 為葡萄糖醛酸、D-葡萄糖；1552 cm^{-1} 屬於 N-乙醯基葡萄糖中的 amide II 和蛋白質中的色胺酸；1657 cm^{-1} 則隸屬於蛋白質中的 amide I 和 α -螺旋；1708 cm^{-1} 為葡萄糖醛酸；1754 cm^{-1} 則為蛋白質中的 C-H 鍵，1708 cm^{-1} 則尚未由文獻中查出。由於後段圖譜由手動修圖，在此將藉由統計分析法進行更進一步的歸納和統整。本研究亦將所提及的官能基整理於表 3-3。

在此做一結論，經過數據處理完後將 12 株 *A. baumannii* 圖譜疊加後比較，於 680、900、1002、1048、1128、1346、1654、1708 和 1754 cm^{-1} 處有明顯的差異。結合細菌培養之藥物測試和拉曼指紋圖譜結果，首先，根據其抗藥性高低進行劃分，在高抗藥組，其 1048 cm^{-1} 蛋白質 C-N 鍵的強度成為一個指標性代表，此特徵峰之強度遠高過其他特徵峰，然於低抗藥組在 1048 cm^{-1} 此峰強度和其餘強度比則明顯低於高抗藥性組，甚至在抗藥性僅 5% 的菌株圖譜中，此特徵峰甚至沒有出現，這也代表此峰可能為細胞膜上的蛋白質，扮演抵擋抗生素的角色。另外，將低抗藥組中抵抗藥物相似的菌株圖譜互相比較，其圖譜相似度極高，也顯現出結構上可能相當接近。

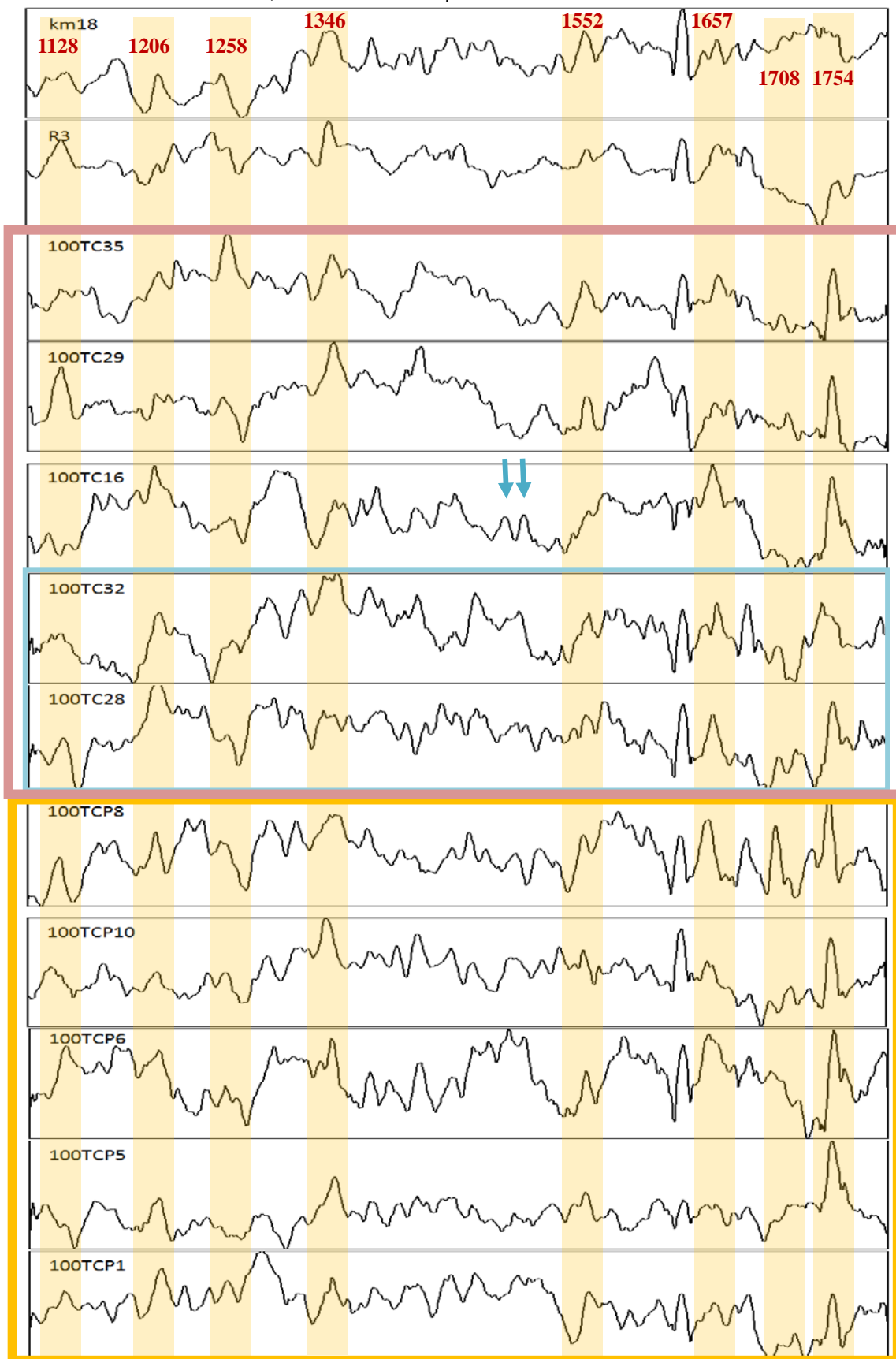


圖 3-44 *A. baumannii* 圖譜表現(1100-1800 cm^{-1})

表 3- 6 A. baumannii 圖譜之官能基的統整

頻率(cm ⁻¹)	碳水化合物	DNA/RNA	蛋白質
453			
485	Man		
594		C	
619			C-C twist
680		G	
754		T	Trp
782			O-P-O str
900		r	
1002		r	Phe
1048			
1128	Man, GlcNac	C, U	C-N str
1206	GIA, Glc, GlcNac		
1346	C-OH, GlcNac		
1552	GlcNac (amide II)		amide II, Trp
1657		amide I, α -螺旋	
1708			
1754			C-H

附註：灰色區域為僅有單一細菌特有或沒有之特徵峰。

Phe-苯丙胺酸；Tyr-酪胺酸；Trp-色胺酸；Val-纈胺酸；Thr-蘇胺酸；O-P-O-磷酸；r-脫氧核糖；A-腺嘌呤；G-鳥嘌呤；C-胞嘧啶；U-尿嘧啶；Man-D-甘露糖；Glc-D-葡萄糖；GlcNac-N-乙醯基葡萄糖；str-伸縮振動；sym-對稱；asym-反對稱；def-變形。強度表示：S-強；M-中等；W-弱。

3.3 拉曼表面增顯粒子

由於拉曼光譜的訊號是較微弱散射光，造成所得的訊號較微弱，使得分析圖譜工作變得不易。於是在本研究中，也嘗試加入增顯奈米粒子，以期能夠增強光譜訊號。本研究使用的奈米粒子為與成功大學張憲彰老師實驗室合作，此奈米粒子以內層為金奈米粒子，於外層包覆 SiO_2 ，利用其金奈米粒子增顯，以 SiO_2 作為保護層，其具有優良的穩定性、無光學作用且無任何化學作用，並不會影響實驗的結果。在此將分為兩階段探討，分別為粒子研磨時間的改變和其含金量的差異。

3.3.1 改變研磨時間

在此利用調整研磨的時間，而達到粒徑大小的改變，在此先將原材料進行拉曼光譜的檢測，以確定沒有其特定的特徵峰而影響之後的實驗結果。本研究也藉由 SEM 和計算其粒徑分佈而證實其此三種粒子確實在粒徑分佈上確實有差異。

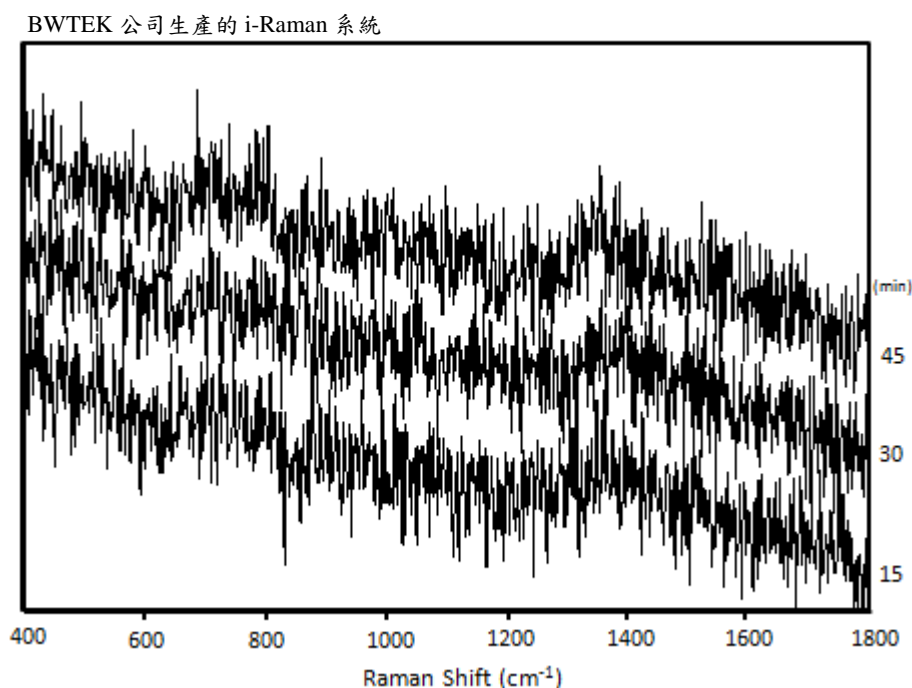


圖 3-45 奈米金粒子光譜(上而下分別是研磨 45、30 和 15 分鐘)

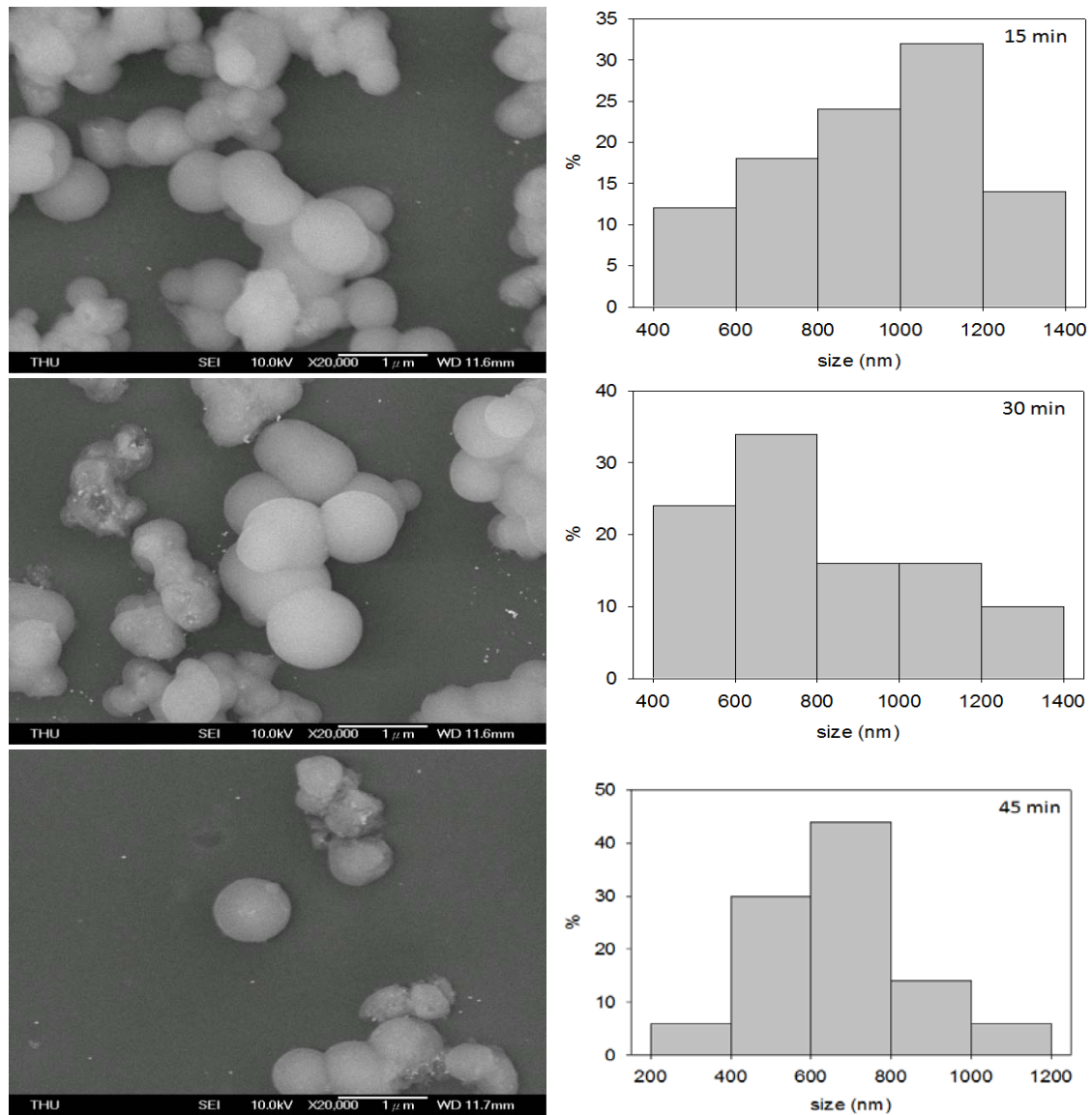


圖 3-46 奈米金粒子 SEM 圖和其粒徑分佈
由上而下分別為研磨 15、30 和 45 分鐘

DTNB(5,5'-Dithio-Bis (2-Nitrobenzoic Acid))分子之 SERS 光譜分析結果

首先，本研究先利用拉曼光譜檢測純的分子探針DTNB(5,5'-Dithio-Bis (2-Nitrobenzoic Acid))。由於DTNB的結構主要是由兩個苯環構成，並且帶有雙硫鍵(S-S)和間位羧酸基。首先先利用其水溶液的DTNB分子和經過室溫蒸散作用後形成咖啡環(coffee ring)的在DTNB分子圖譜進行不同濃度比較。由圖譜中可看到，直接利用水溶液樣本進行檢測，的確可以讀取其光譜訊號，然其訊號強度和清晰程度卻不如利用coffee ring 方式所得的訊號，

除了在 1340 cm^{-1} 位置的碳原子和硝基之間的對稱振動($\nu(\text{C}-\text{NO}_2)$)有著非常強烈的訊號外，其於訊號像是 $1075\text{ cm}^{-1}(\nu(\text{C}(\text{aromatic ring})-\text{S}))$ 、 $1160\text{ cm}^{-1}(\text{C}-\text{C stretching})$ 及 $1570\text{ cm}^{-1}(\nu(\text{C}=\text{C}), \text{aromatics})$ 在水溶液樣本上則不如coffee ring 樣本佳，這也更加證明使用coffee ring 方式的益處[54-55]。

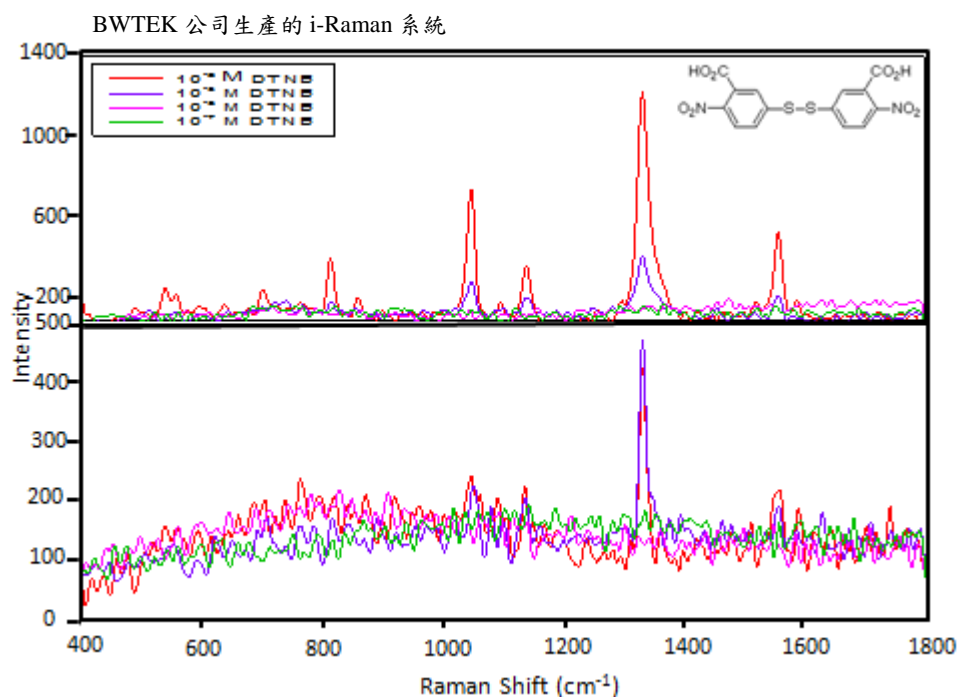


圖 3-47 水溶液樣本所得之 DTNB 拉曼圖譜
(上) coffee ring 樣本 (下) 水溶液樣本

本研究亦將利用研磨 15、30 及 45 分鐘的奈米增顯粒子和其分子探針 DTNB(1 mM)混合，以 $N=5$ 之平均值呈現圖譜於圖 3-46。當 DTNB 與金奈米粒子混合均勻後，其雙硫鍵(S-S)會斷裂，轉向與金鍵結為硫金鍵(S-Au)，而以 TNB(2-nitro-5-thiobenzoic acid)的型式鍵結 Au，然因 DTNB 可視為兩 TNB 結合的對稱分子，所以此結果並不會使其光譜產生改變。由圖譜可得知，加入奈米金粒子後，效果以研磨 45 分鐘粒子增顯效果最佳。

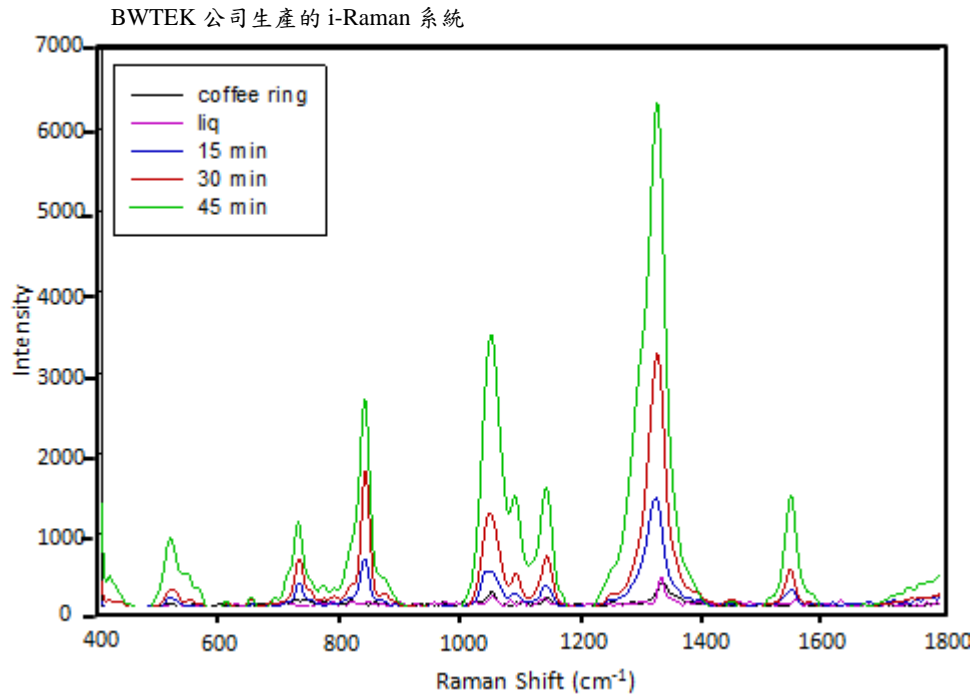


圖 3-48 1 mM DTNB 混合奈米金(15、30 及 45 分鐘)指紋圖譜

除此之外，本研究也將不同濃度的 DTNB(10^{-3} 、 10^{-5} 、 10^{-7} M)分別和等量的去離子水和奈米金粒子混合，以確保兩者是在同樣的濃度。由圖 3-47 看來，沒有加入奈米金的訊號僅 10^{-3} M 濃度有明顯訊號，並且於 10^{-5} M 就無明顯特徵峰訊號。而有加入奈米金的則是於 10^{-3} M 其強度可高達約 6500，甚至加了奈米金的 10^{-5} M 特徵峰強度還高過未加奈米金的 DTNB。由此可證明，奈米金粒子確實能發揮其拉曼表面增顯效應。在此以 1340 cm^{-1} 特徵峰計算其強度，並且比較呈現如圖 3-48。

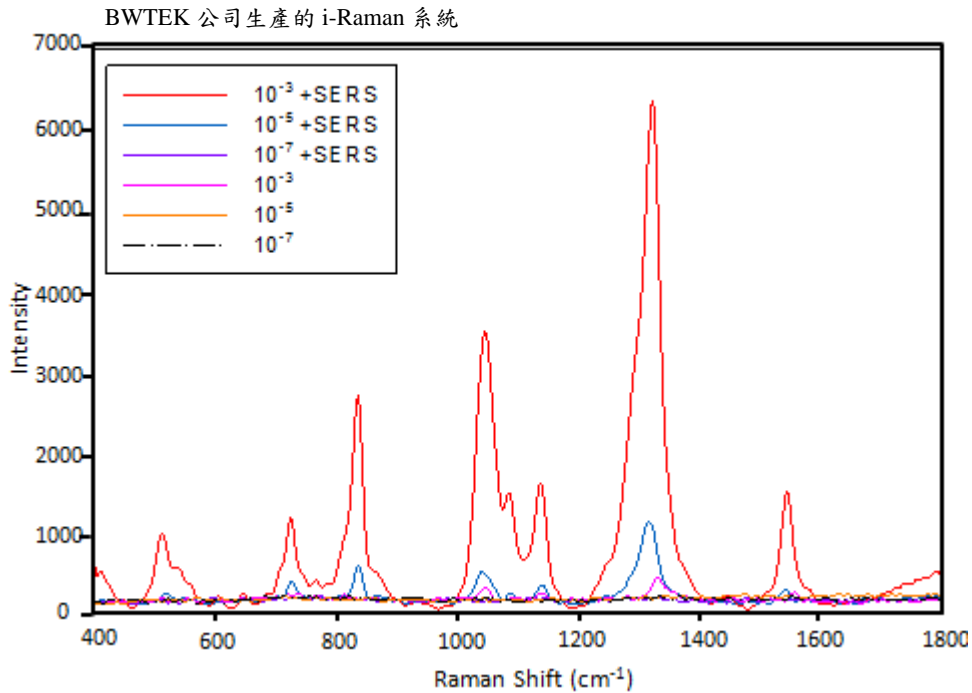


圖 3-49 不同濃度 DTNB 加入 45 分鐘磨製的奈米金之增顯圖譜

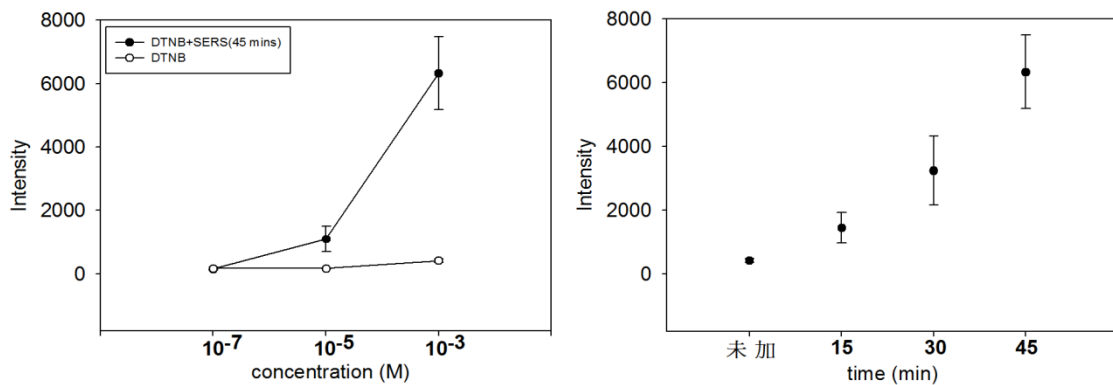


圖 3-50 計算 1340 cm^{-1} 之增顯強度

(左)不同濃度 DTNB 與磨製 45 分鐘之奈米金混和；(右)不同磨製時間的奈米金

細菌(*A. baumannii*)之 SERS 結果

奈米增顯粒子用於小分子有效後，本研究也更進一步將其運用於細菌的檢測，在此舉 KM18 為例，由圖 3- 49 可以看到，黑色線段為菌液以去離子水等比例稀釋，紅色線則為是加了不同研磨時間奈米金後的結果。透過圖譜，會發現並非一整段圖譜皆會增顯其訊號，而是呈現增顯片段的方式，其原因為每種官能基所需激發的能量不盡相同，本研究使用 785 nm 的雷射波長，其照射到奈米粒子後，所產生的表面電漿共振能量，剛好激發這些區域的官能基，使其特徵峰強度增強。由圖 3- 49 所呈現的結果，以 45 分鐘研磨的奈米金增顯效果最佳，反而加 15 分鐘的粒子在 800-1100 區域甚至還較純菌強度低，其可能性為奈米粒子沒有和細菌結合的很好，並沒有均勻分散於菌的四周(圖 3- 50 右上方)，或是菌堆疊緊密蓋過奈米粒子，造成無法發揮增顯效應，另外需考慮的是粒子與待測物之大小比例問題，皆有可能影響檢測結果，而最佳的狀況應該如圖 3- 50 的左下方，奈米金和細菌均勻混合。在此挑選出三特徵峰，進行其不同粒子和其強度的標準差及比較。

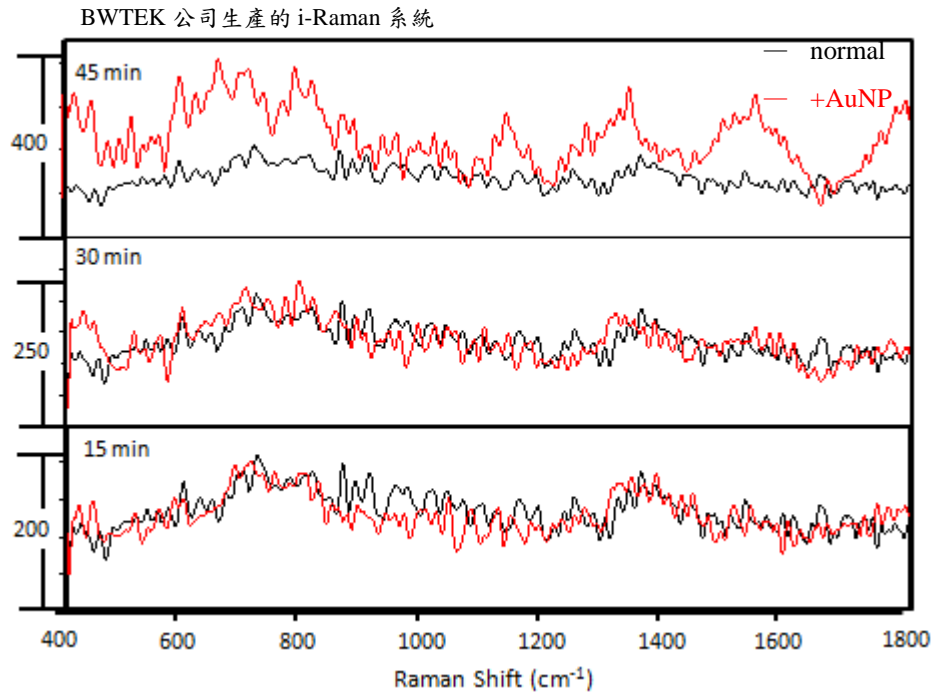


圖 3- 51 不同磨製時間之奈米金與 KM18 混合之圖譜

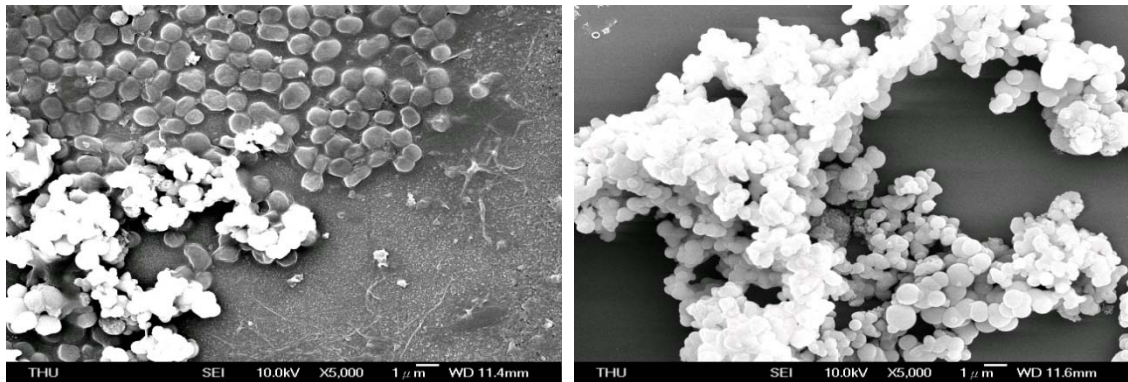


圖 3- 52 奈米金與細菌結合的分佈情形

(左)左下角為細菌與奈米金較佳結合情形，右上角為奈米金無法均勻分散；
(右)奈米金堆疊。

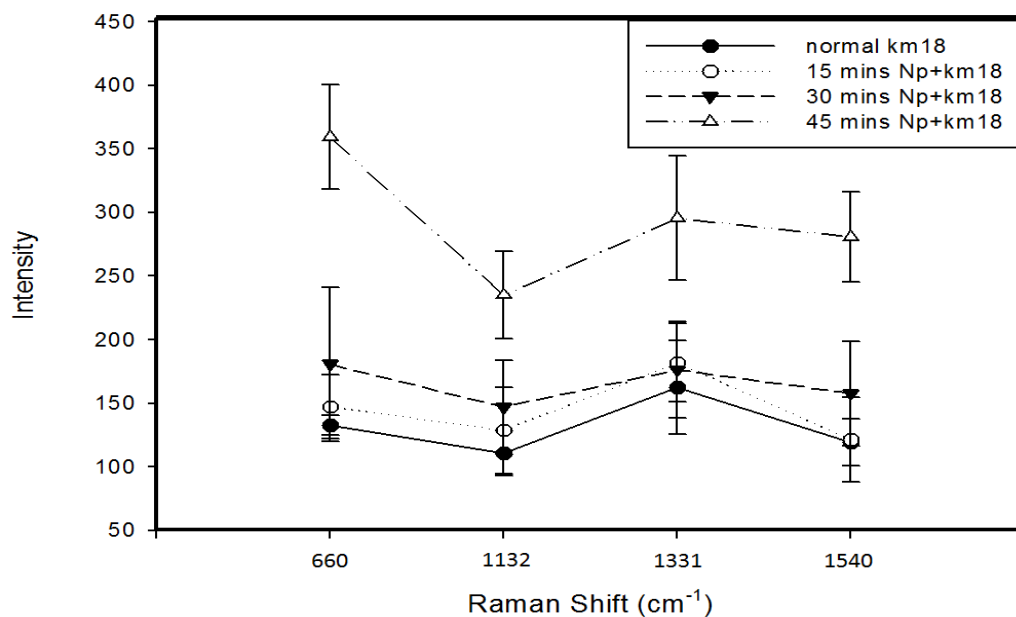


圖 3- 53 KM18 增顯後強度計算

噬菌體(*A. baumannii* 噬菌體)之 SERS 結果

在此，噬菌體以 ϕ KM18 代表，其結果一樣在特定區域有明顯的增顯效應，甚至於較細菌的增顯倍數高。但儘管噬菌體的特徵峰強度有增強，但增強後的背景螢光訊號也相對增加。另外，於 15 分鐘這組結果依舊在增顯後其強度更低於原始噬菌體的圖譜，且在此亦更明顯。研判可能其噬菌體的尺寸(40-200 nm)和粒子尺寸相距甚遠，變成可能形成一顆粒子需要許多噬菌體碰觸的情形，甚至若無均勻混合，則遮蔽效應亦會更嚴重，所以在不同的樣本上可能需要不同尺度之增顯粒子和濃度比例。

BWTEK 公司生產的 i-Raman 系統

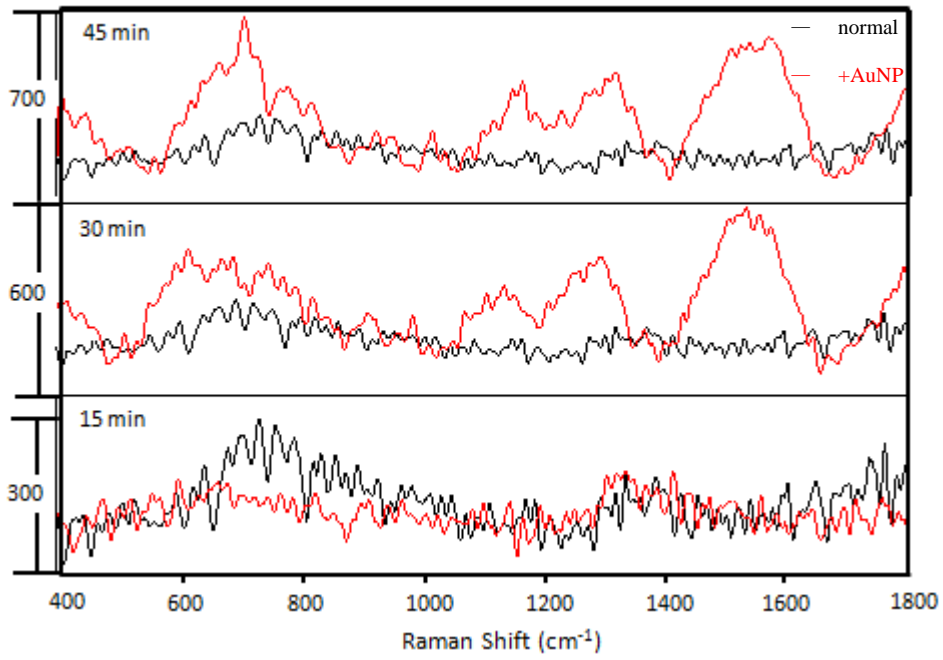


圖 3- 54 不同磨製時間之奈米金與 ϕ KM18 混合之圖譜

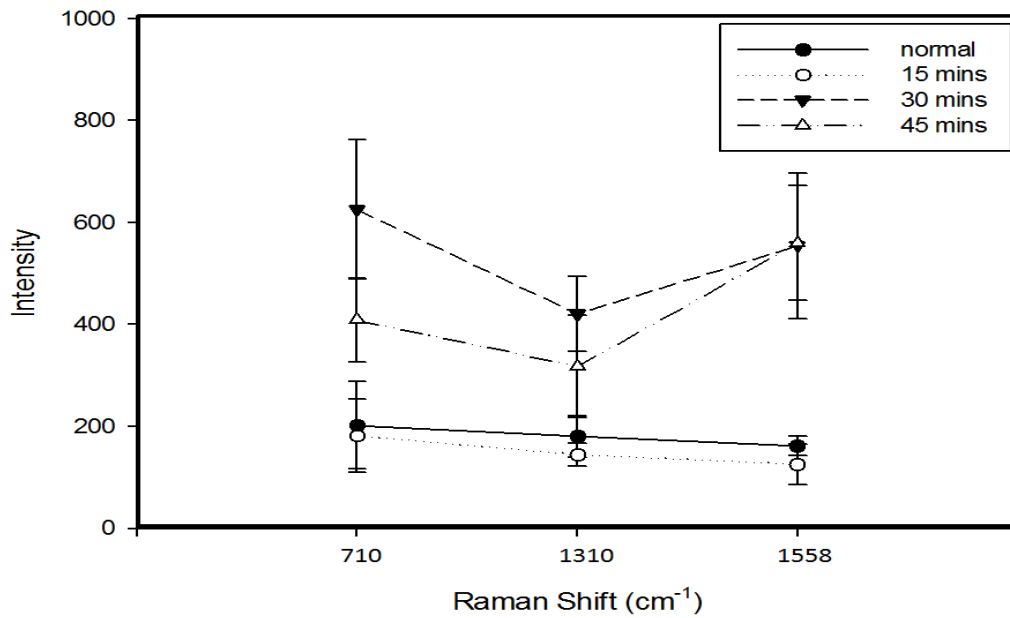


圖 3- 55 ϕ KM18 增顯後強度計算

3.3.2 含金比例不同

DTNB(5,5'-Dithio-Bis (2-Nitrobenzoic Acid))分子之 SERS 光譜分析結果

本研究除了針對粒子尺度進行分析外，也根據其粒子的含金比例進行分析，在此分別利用 0%、2%、8%、13%和 30%的奈米金粒子作為增顯粒子，嘗試和 DTNB 分子探針、細菌和噬菌體混合，並試其增顯效果。在此我們也依序放上其粒子的拉曼圖譜(圖 3-54)及 SEM 圖與其粒子大小分佈圖(圖 3-55)。

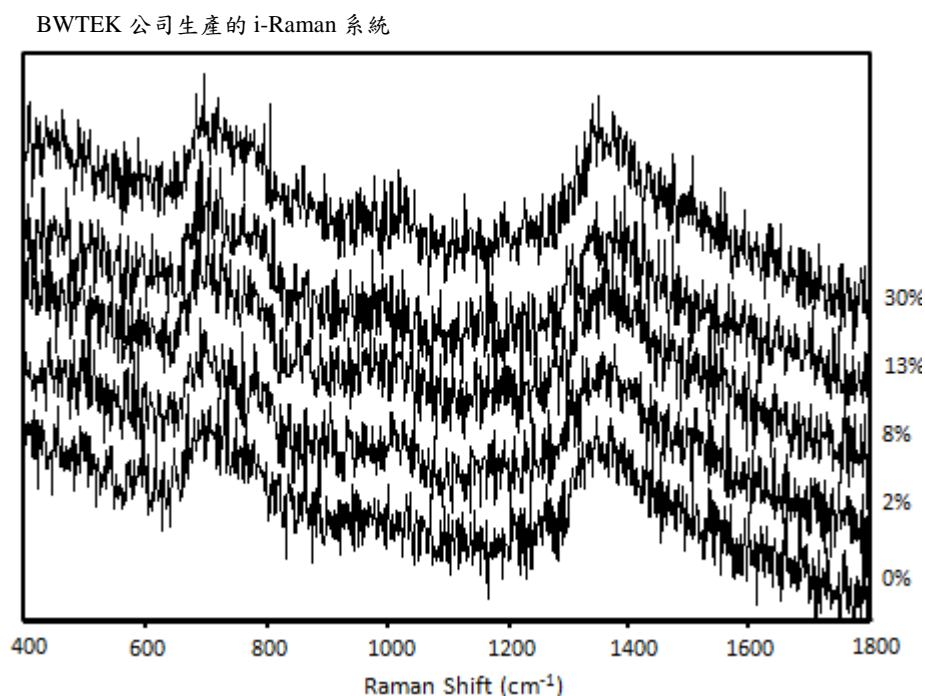


圖 3-56 不同含金比例的奈米粒子拉曼圖譜

針對含金比例不同的粒子，本研究利用奈米金粒子(0%、2%、8%、13%和 30%)與分子探針 DTNB(1 mM)混和進行檢測。結果如圖 3-56，其分子的增顯強度隨著含金比例上升而增強，其原因可能為含金的比例越高，其 DTNB 所能鍵結的 S-Au 鍵也就越多，所以其所增顯的效果則越佳。

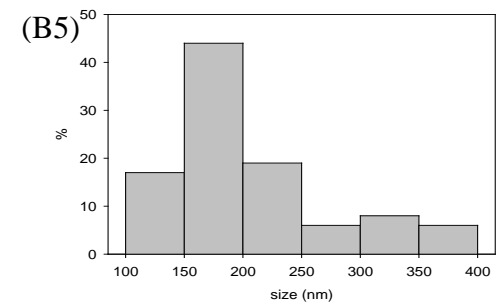
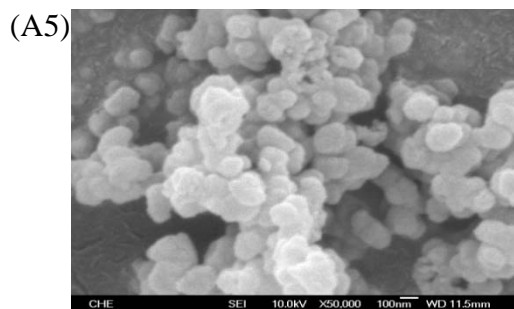
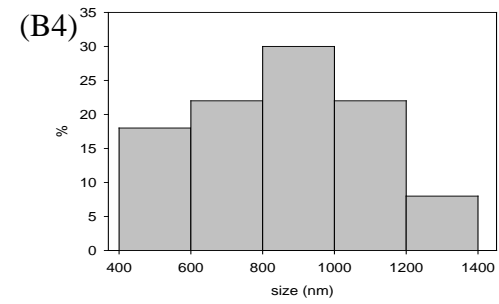
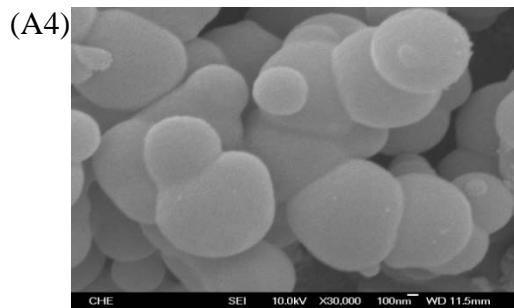
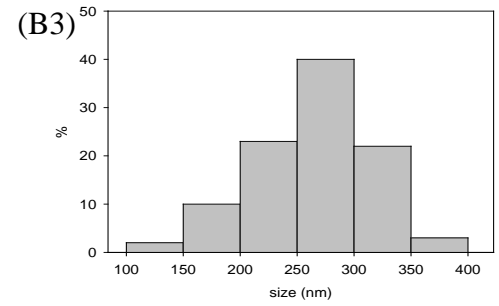
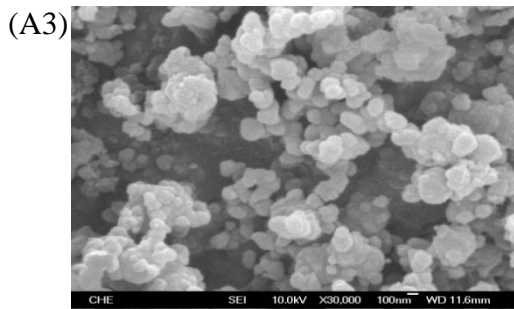
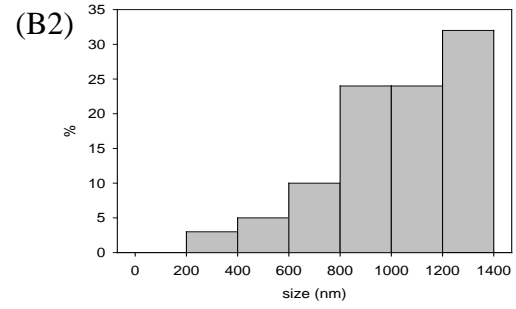
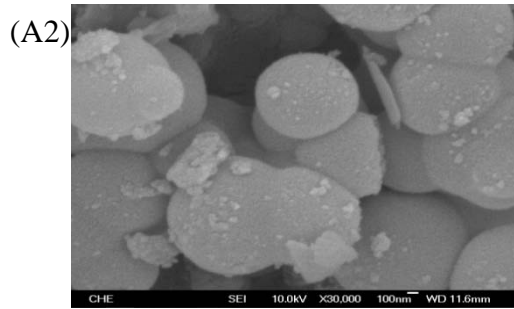
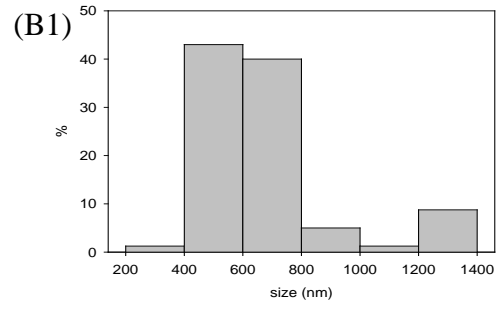
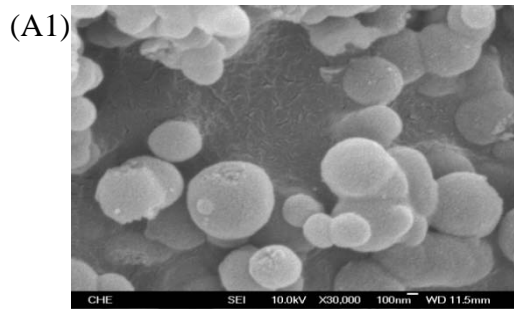


圖 3- 57 奈米金(A)SEM 圖和(B)粒徑分佈圖(1~5 分別為 0%、2%、8%、13%、30%)

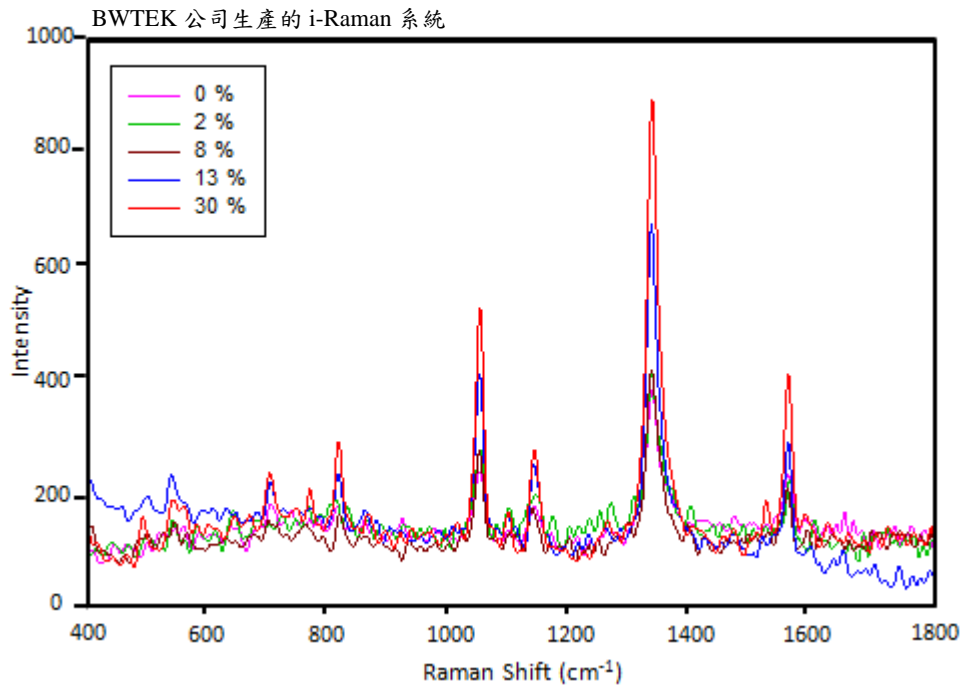


圖 3- 58 不同含金比例之奈米金粒子和 DTNB(1 mM)混和之 SERS 光譜圖

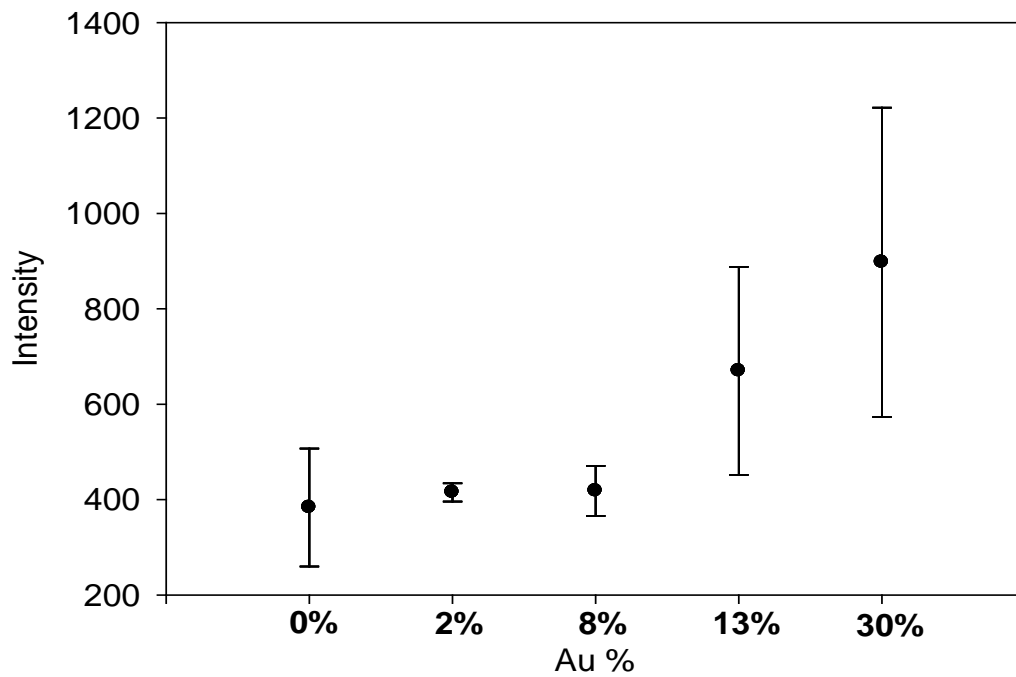


圖 3- 59 加入不同含金比例奈米金的 DTNB 增顯效果

細菌(*Acinetobacter baumannii*)

本研究在此亦利用其含金比例不同的奈米金加入細菌和噬菌體中，並且對結果進行探討，在此所選用的代表菌株為 KM18 和其噬菌體。首先，將 KM18 和奈米金(0%、2%、8%、13%和 30%)以 5:2 比例混合，並且利用拉曼檢測，得圖 3- 58。其結果與 DTNB 同，以 30%的奈米金結果為最佳。另外，本研究也以改變細菌濃度(200、400、600、800 ml 之 10^9 CFU/ml)固定粒子含金比例(8%)來證明當細菌量越多時，也會造成其圖譜強度增強。在此本研究也也將 0%和 30%進行強度強度比較，如圖 3- 61。奈米金與細菌結合之情形則顯示於圖 3- 58，可看到底部鋪平了許多細菌，在圖上的 A 部分，則僅有細菌並無奈米金，而 B 部分則細菌和奈米金互相混合於一團，C 部分則奈米金過多覆蓋於細菌上。這些細菌與奈米金結合之情形，將會影響到本研究所收集到之圖譜的增顯效果。

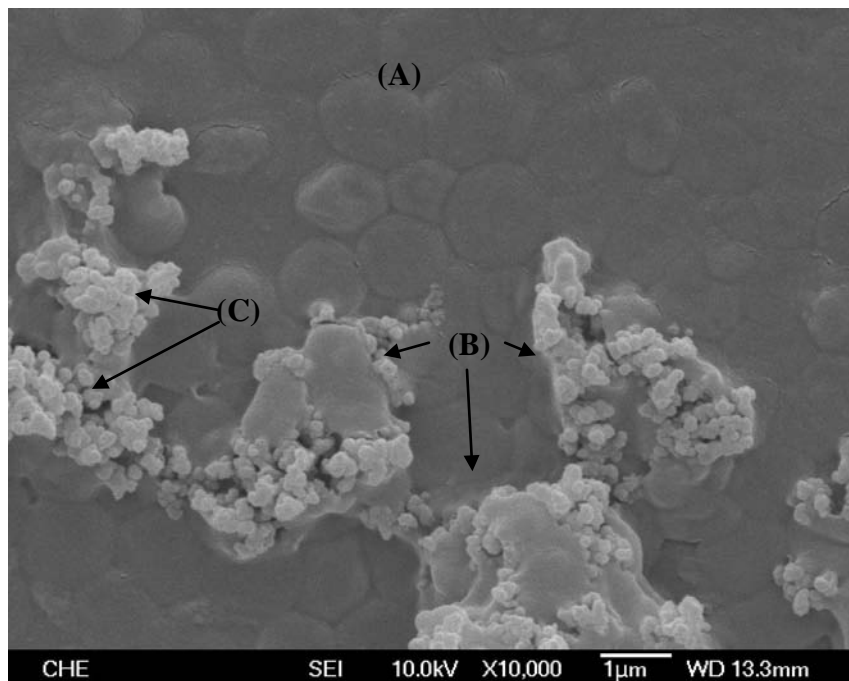


圖 3- 60 KM18 與奈米金(30%)之結合情形

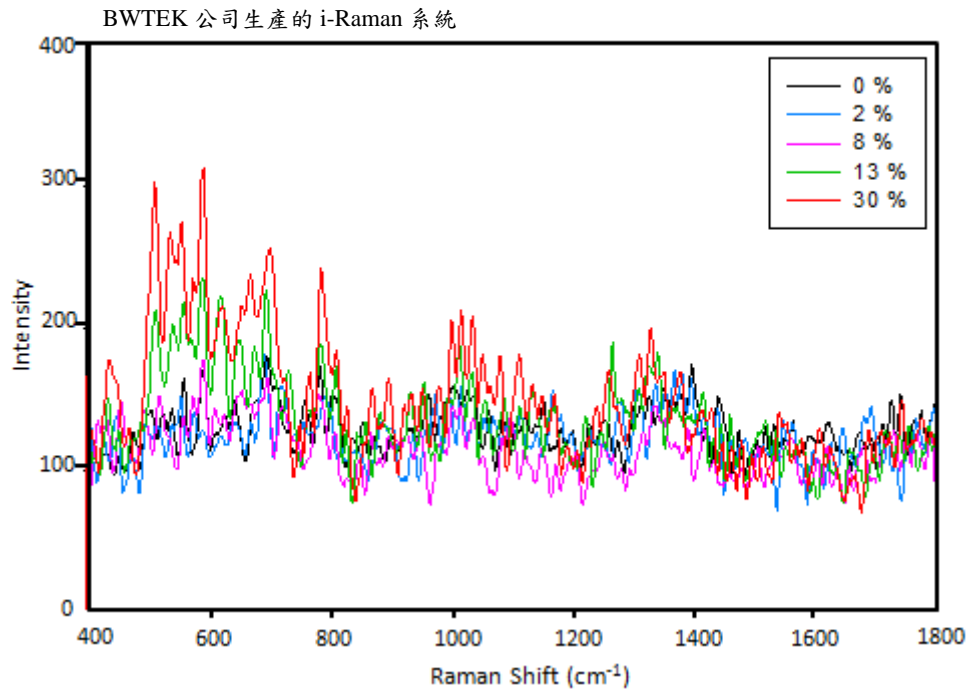


圖 3- 61 KM18 加入 0%、2%、8%、13%和 30% 奈米金之光譜圖

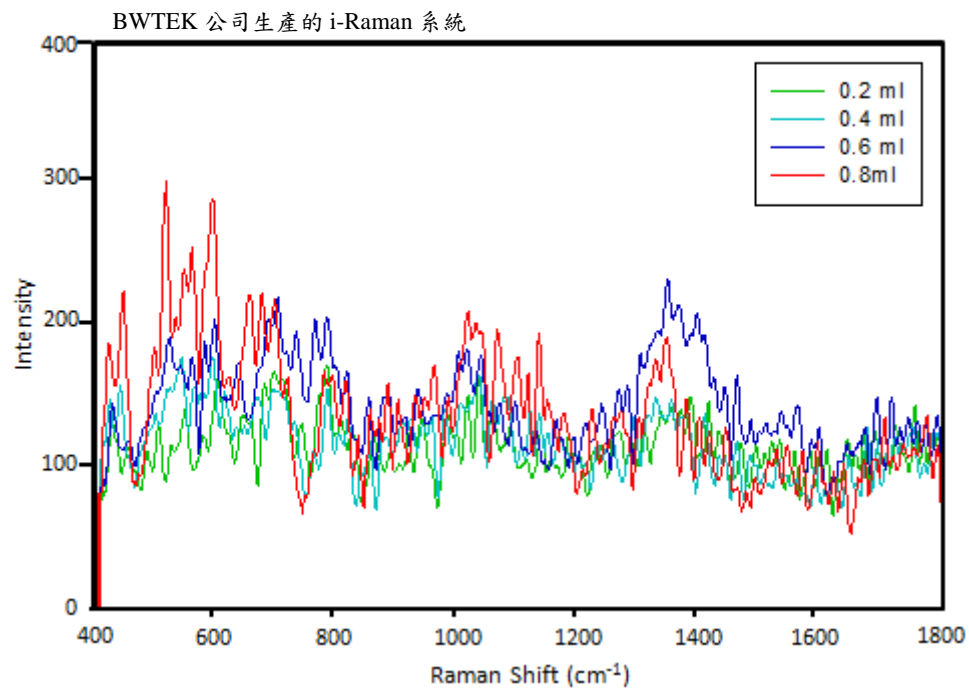


圖 3- 62 不同濃度 KM18 加入 8% 奈米金之光譜圖：0%、2%、8%、13% 和 30%

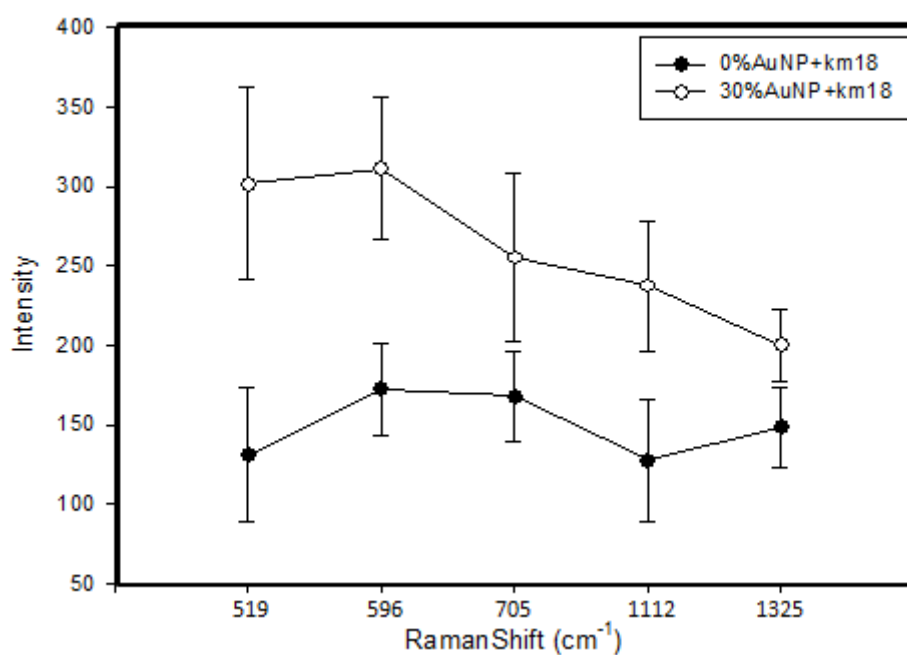


圖 3- 63 以 0%和 30%奈米金混合 KM18 之特徵峰強度計算

噬菌體(*Acinetobacter baumannii* 噬菌體)之 SERS 光譜分析

在噬菌體加上含金量不同的奈米金混合，同樣控制了其濃度變因以及含金量變因。然相對於 DTNB 和細菌而言，此批粒子與噬菌體的混合後增顯效果並不佳。可能的原因為粒子研磨所故造成奈米金聚集而使其分散性不佳所產生。然此則需有待進一步進行粒子分散性評估，方能了解。

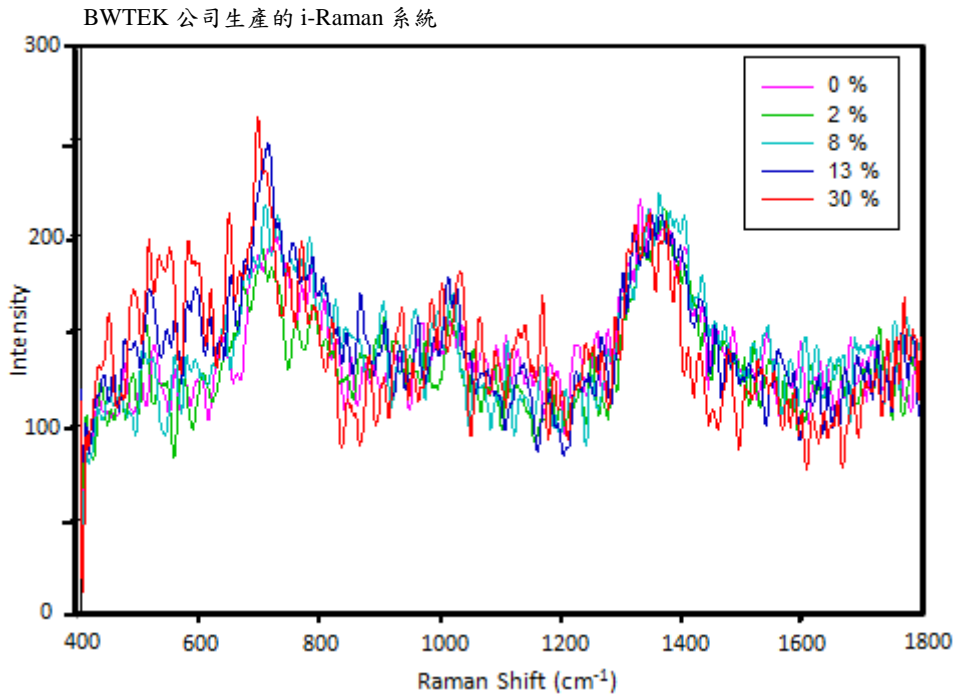


圖 3- 64 ϕKM18 加入 0%、2%、8%、13%和 30% 奈米金之光譜圖

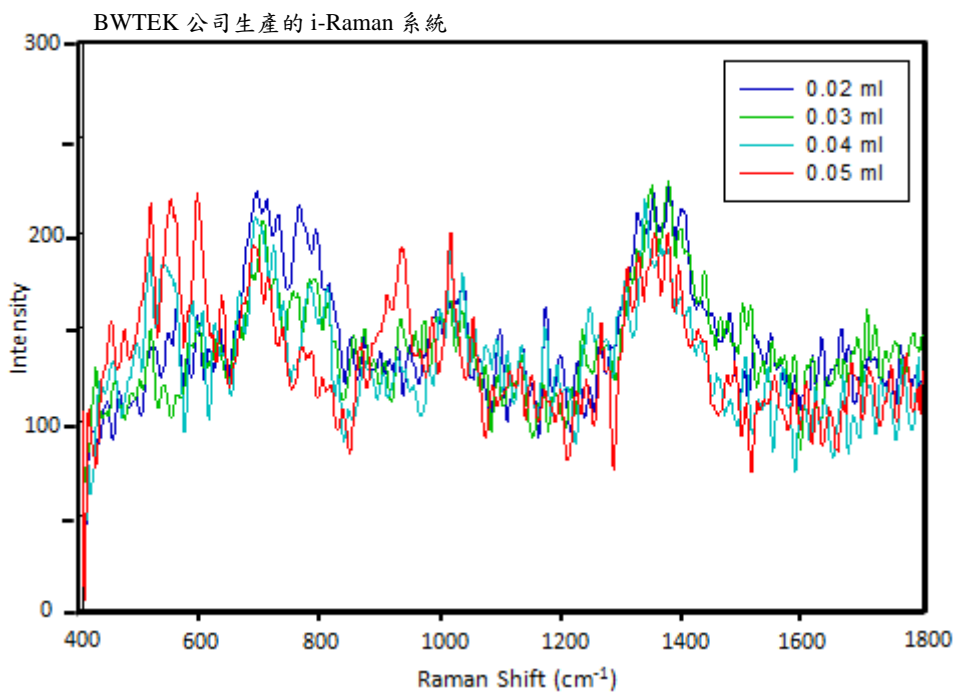


圖 3- 65 不同濃度 ϕKM18 加入 8% 奈米金之光譜圖

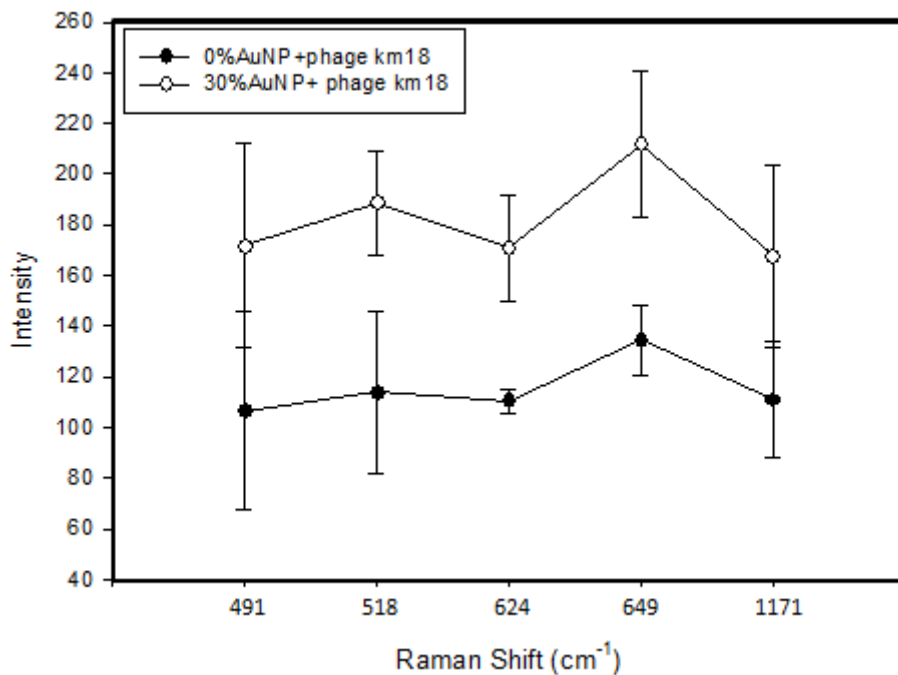


圖 3-66 以 0% 和 30% 奈米金混合 ϕ KM18 之特徵峰強度計算

本研究欲使用表面增顯拉曼效應(SERS)，首先將 Au 包覆 SiO_2 之奈米粒子加入樣本中，在此先以 DTNB 分子探針進行檢測，證實利用 coffee ring 原理樣本處理手續，所得的訊號較水溶液樣本佳。並將兩批奈米金分別為改變研磨時間和含金比例加入樣本中，結果證實，當研磨時間長而造成奈米粒子尺寸較小，其增顯效果較佳；含金比例高(30%)雖然其效果為組內最佳，但由於此批奈米金尺寸不一，在此則無法加以定論，未來若能自行合成奈米粒子，則將更加注意此方面的條件控制。然增顯之效果不佳則需考慮奈米金之尺寸(不同樣本大小搭配不同尺寸之奈米粒子)、粒子分散和與樣本結合程度和奈米金存放可能污染等問題，甚至於生物樣本所適合之 pH 值調控等都是重要的變因。另外若奈米金存放久後，金粒子可能會與空氣中的硫鍵結，而這些都有可能是造成效果不佳的原因。

第四章 結論與未來展望

拉曼光譜檢測細菌和噬菌體，透過其圖譜和強度比較，甚至於是官能基對照，可以初步分析和全面性的比對不同的細菌和不同噬菌體。

由本研究之結果呈現，由於沙門氏菌(*Salmonella* Ed2)、鮑式不動桿菌(*A. baumannii* KM18)和克雷伯氏菌(*K. pneumonia* NK5)皆為革蘭氏陰性菌，所以主要的結構都很相似，比較其拉曼指紋圖譜，主要的形式也大致相同。然經由數據處理後，比較圖譜之特徵峰強度和官能基，鮑式不動桿菌於 737、954、1379 cm^{-1} 的位置有別於另外兩株細菌之圖譜，而這些特徵峰大部分屬於碳水化合物的官能基振動，顯示鮑式不動桿菌相較其他兩株細菌，可能含有較多的碳水化合物成分。而克雷伯氏菌則於 1754 cm^{-1} 有明顯異於其他兩者的特徵峰，此峰屬於蛋白質上的 C-N 振動；鮑式不動桿菌(KM18)則獨特於 1502 cm^{-1} 有明顯特徵峰，此峰則屬於 DNA 中的腺嘌呤，由圖譜皆顯示出其在結構上的些微差異。而噬菌體 ϕ KM18 於 1184 cm^{-1} 處有一特殊特徵峰是 ϕ NK5 和 ϕ L2 所沒有的，但尚未有所對應的官能基的資訊；於 1002 cm^{-1} 處苯丙胺酸是僅為 ϕ NK5 所有，而 1145 cm^{-1} 則是僅 ϕ NK5 所沒有；而 ϕ L2 則是於 1037 和 1570 cm^{-1} 處無此特徵峰，其餘噬菌體皆有，而此兩特徵峰則分別代表 DNA 和蛋白質，這也表示出其結構上可能的不同。

除此明顯差異外，亦用 Barcode 型式，更可針對全圖譜進做更細微的區分菌株，目前雖僅用條碼(barcode)型式進行初步區分。未來仍需配合生化領域介入，透過純化其細菌或噬菌體的重要蛋白質進行拉曼光譜的數據庫建立，使其可以更加確切證明其所產生的特徵峰再進行比對，甚至須運用於統計分析的方法進行更進一步的歸類與劃分。

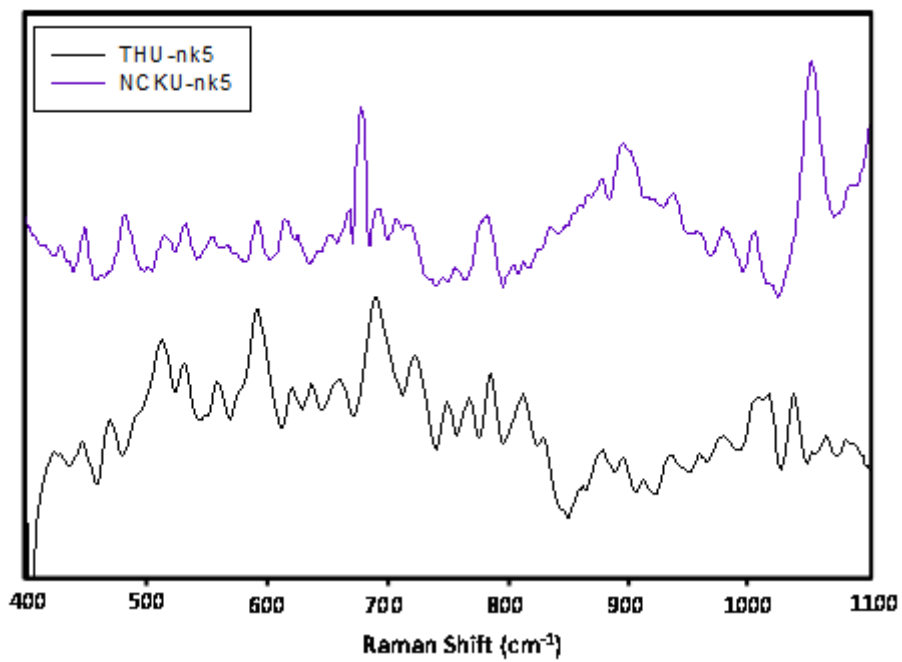
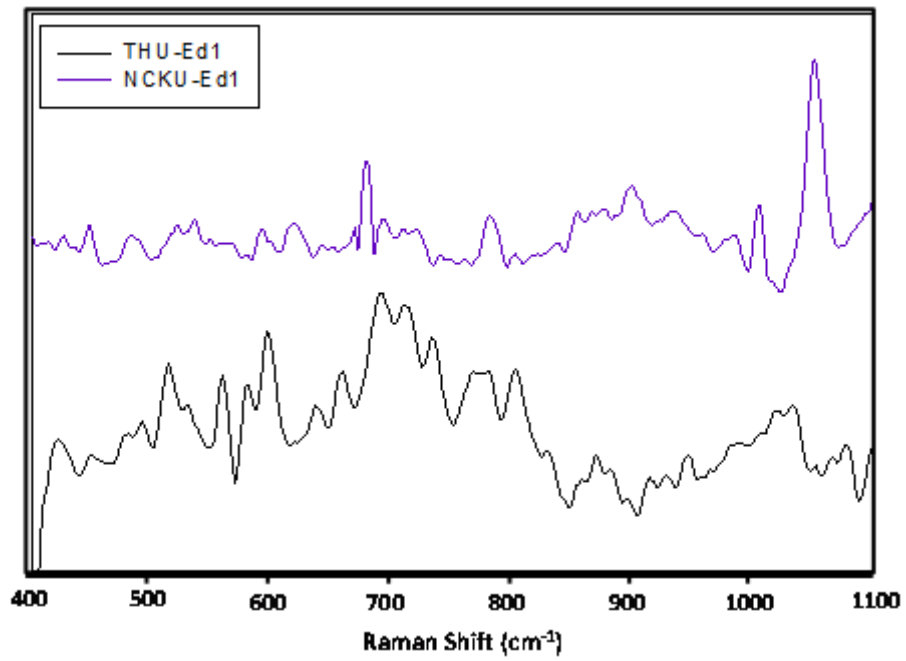
可攜式拉曼系統與桌上型拉曼系統在圖譜的分析上，由於軟體之處理，可攜式系統的強度分佈相較於桌上型拉曼系統較不明顯，但在特徵峰的表

現上，則相差不遠。

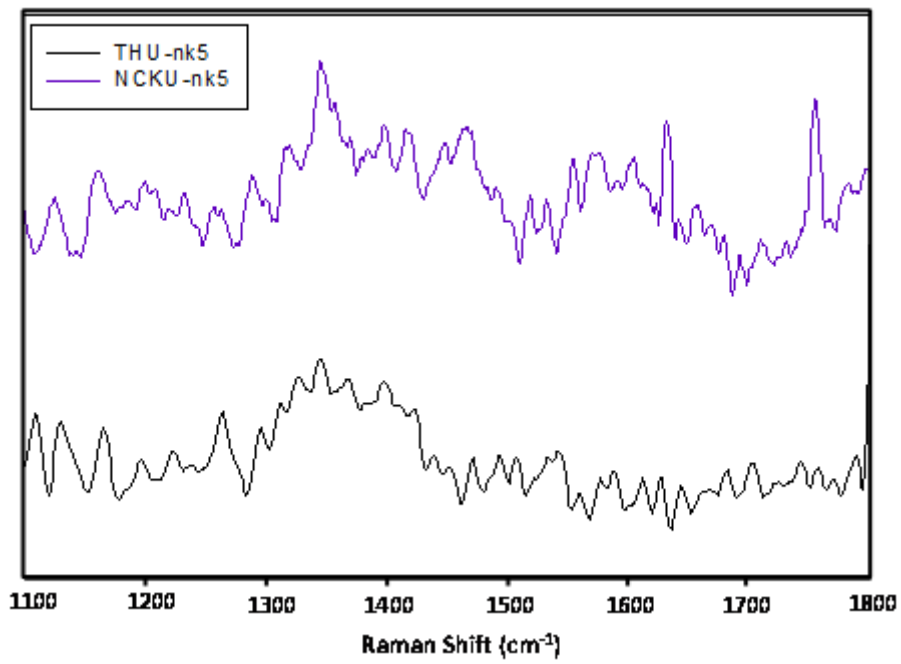
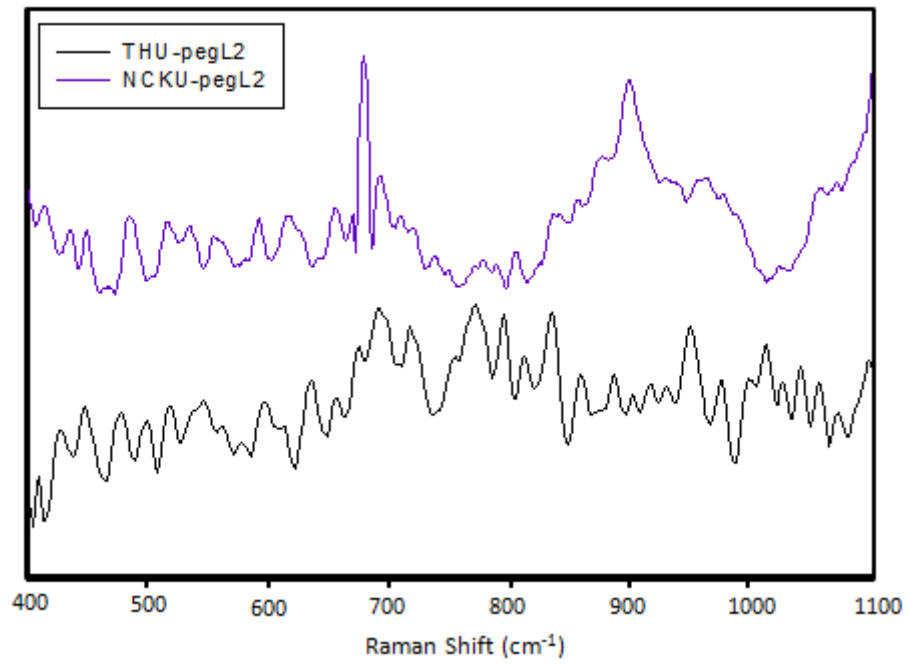
結合細菌培養之藥物測試和拉曼指紋圖譜結果，以分析 10 株 *A. baumannii*。首先，本研究發現，在此 1048 cm^{-1} 特徵峰：蛋白質 C-N 鍵官能基為的強度成為一個指標性代表。根據其抗藥性高低進行劃分，在高抗藥組之整體圖譜在 $400\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ 片段特徵峰強度呈現微弱然卻只有在此特徵峰(1048 cm^{-1})呈現極強的狀態；然於低抗藥組在 $400\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ 部分之 1048 cm^{-1} 特徵峰強度和其餘強度則屬強或中，甚至在抗藥性(100TC28 和 100TC32)僅 5%的菌株圖譜中， 1048 cm^{-1} 特徵峰甚至沒有出現。另外，將低抗藥組中抵抗藥物相似的菌株圖譜(100TC29 和 100TC35)互相比較，其圖譜相似度極高，也顯現出結構上可能相當接近。然未來若透過其蛋白質資訊和統計分析搭配則仍更輕易分辨出。

而拉曼表面增顯效應則透過其表面電漿的共振，增強了圖譜訊號，在此改變含金比例組，研磨時間改變粒子大小和含金比例改變進行增顯效果的比較，結果證實，當研磨時間長而造成奈米粒子尺寸較小，其增顯效果較佳；含金比例高(30%)雖然其效果為組內最佳，但由於此批奈米金尺寸不一，在此則無法加以定論，未來若能自行合成奈米粒子，則將更加注意此方面的條件控制。然增顯之效果不佳則需考慮奈米金之尺寸(不同樣本大小搭配不同尺寸之奈米粒子)、粒子分散和與樣本結合程度和奈米金存放可能汙染等問題，甚至於生物樣本所適合之 pH 值調控等都是重要的變因。另外若奈米金存放久後，金粒子可能會與空氣中的硫鍵結，而這些都有可能造成效果不佳的原因。

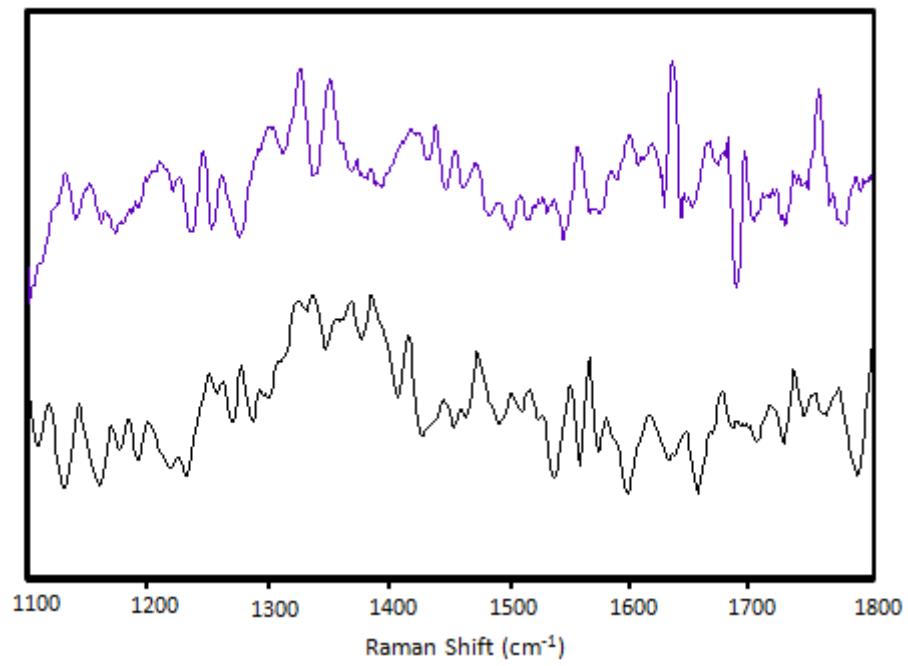
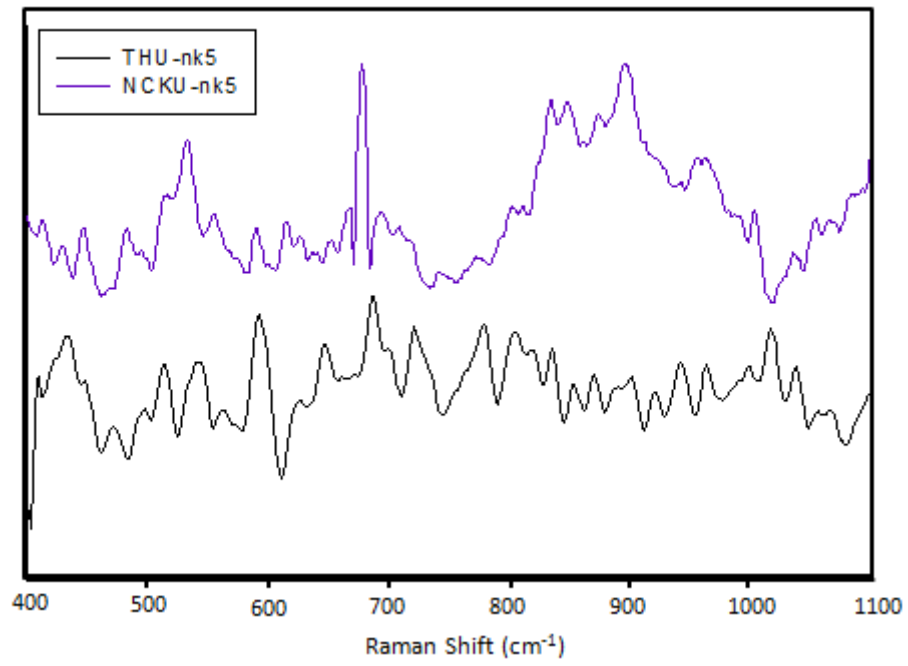
附錄



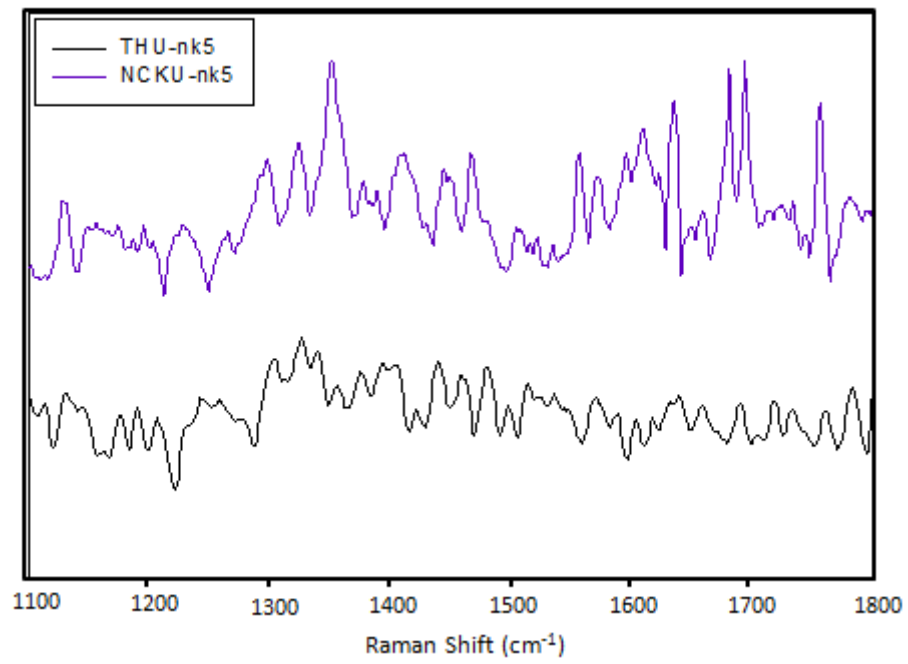
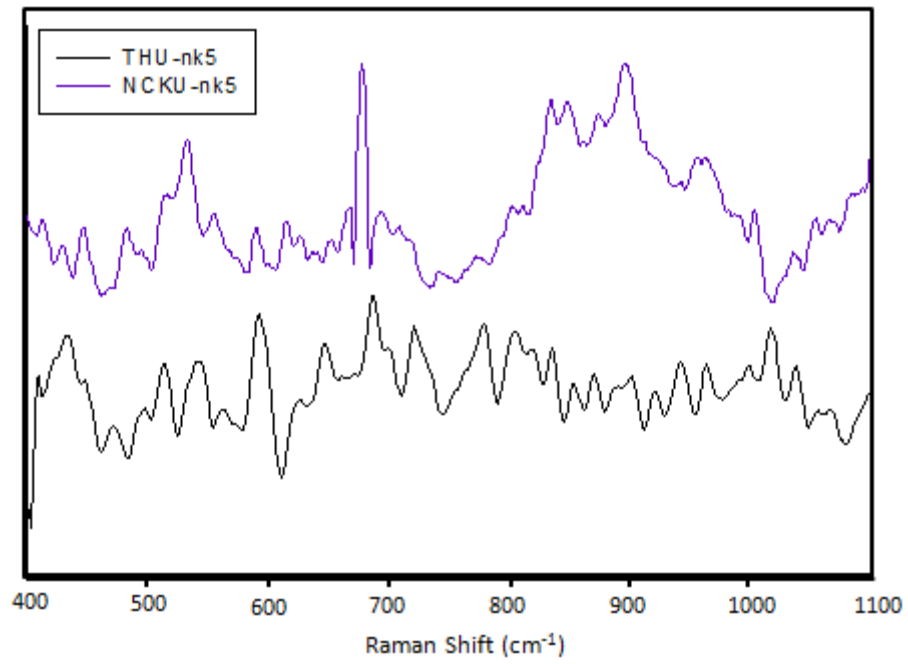
附錄 1 桌上型拉曼系統與可攜式拉曼系統之 Ed2 圖譜比較



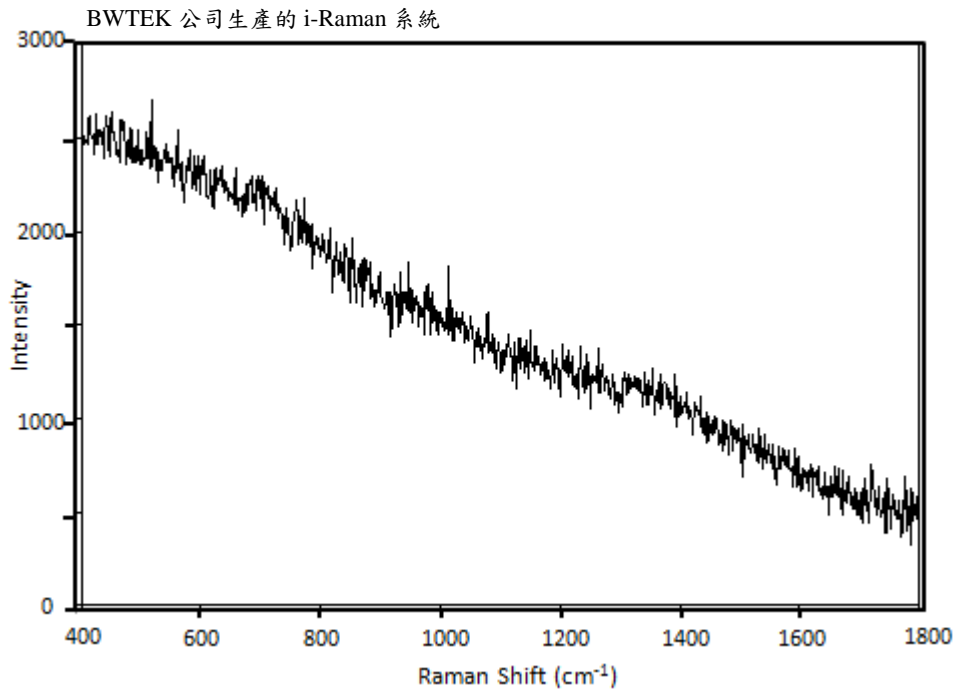
附錄 2 桌上型拉曼系統與可攜式拉曼系統之 NK5 圖譜比較



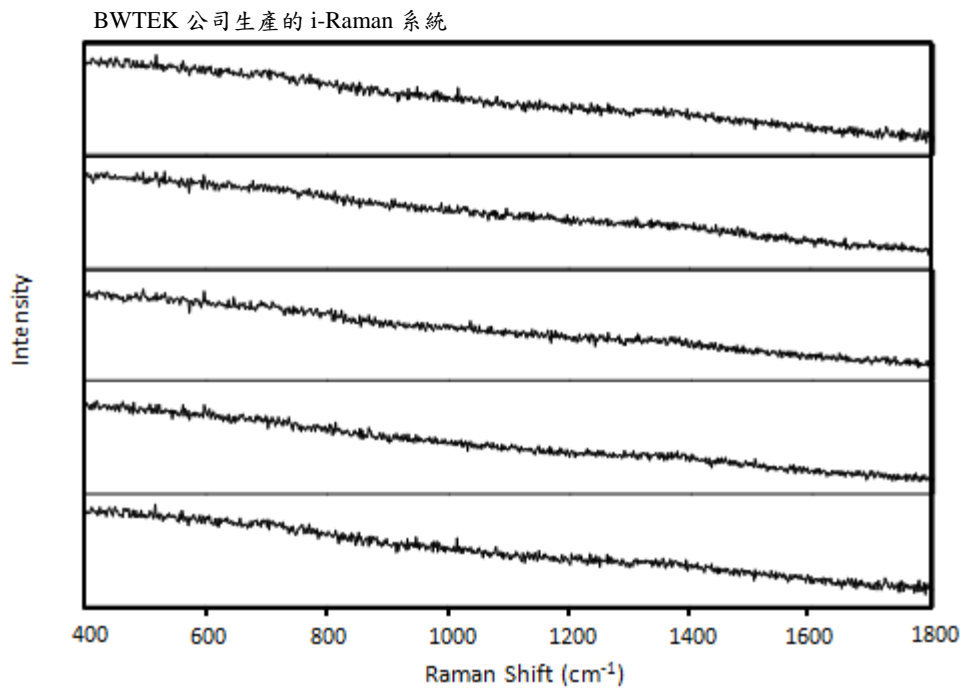
附錄 3 桌上型拉曼系統與可攜式拉曼系統之 ϕL2 圖譜比較



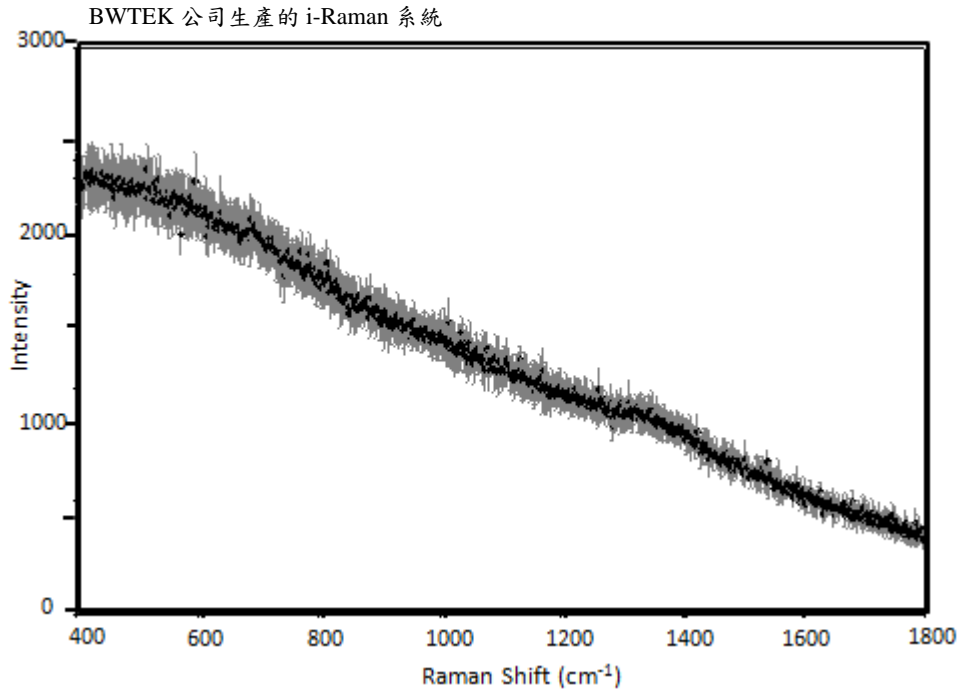
附錄 4 桌上型拉曼系統與可攜式拉曼系統之 ϕ NK5 圖譜比較



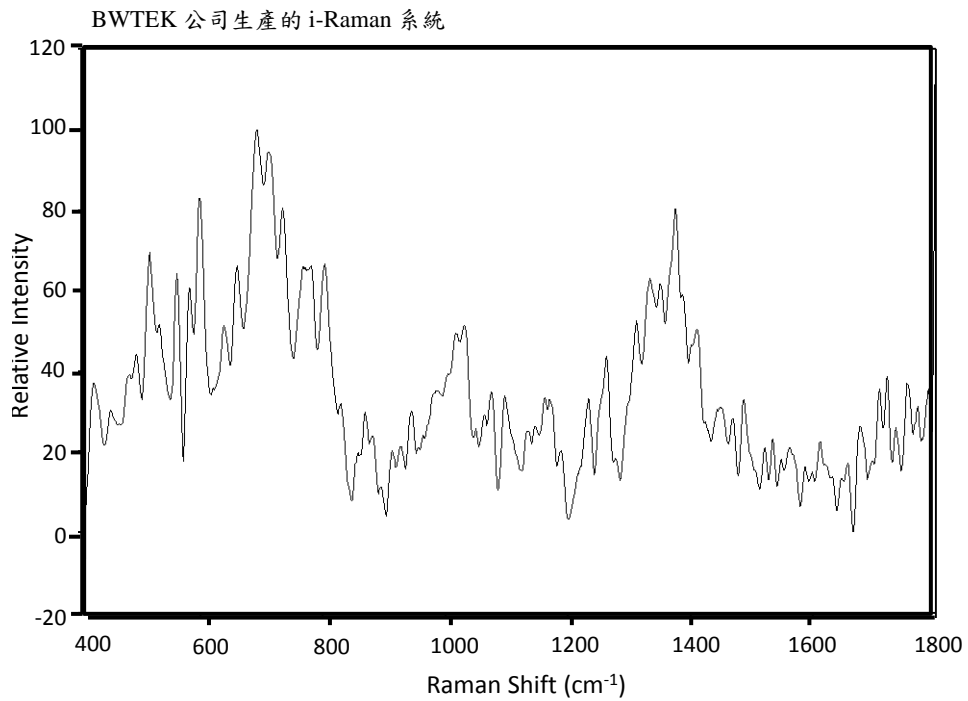
附錄 5 可攜式拉曼系統之 Ed2 單一圖譜



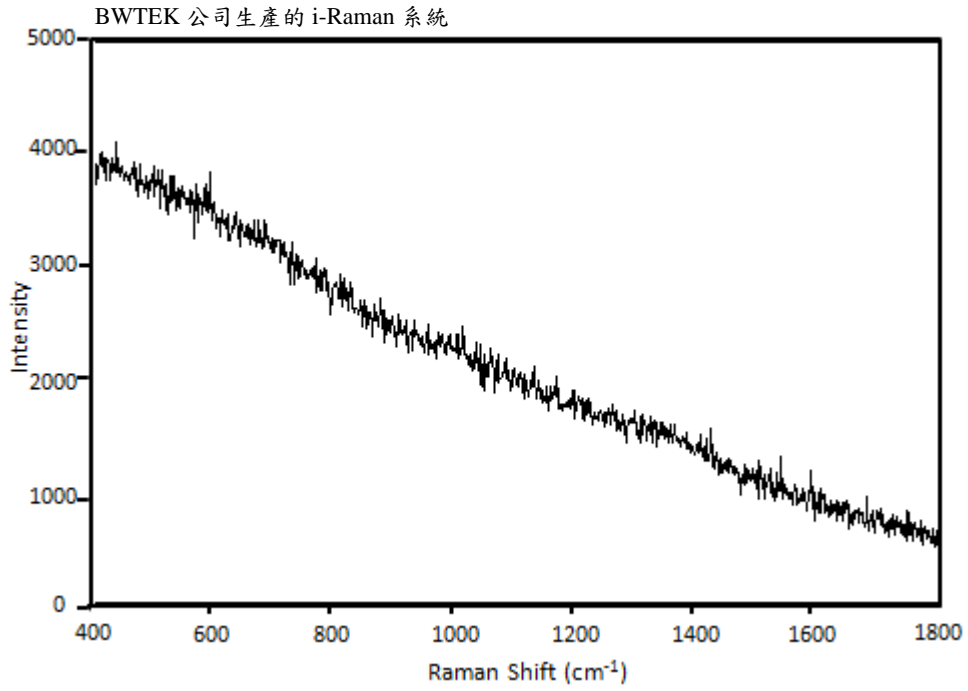
附錄 6 可攜式拉曼系統之 Ed2 圖譜再現性特性(N=5)



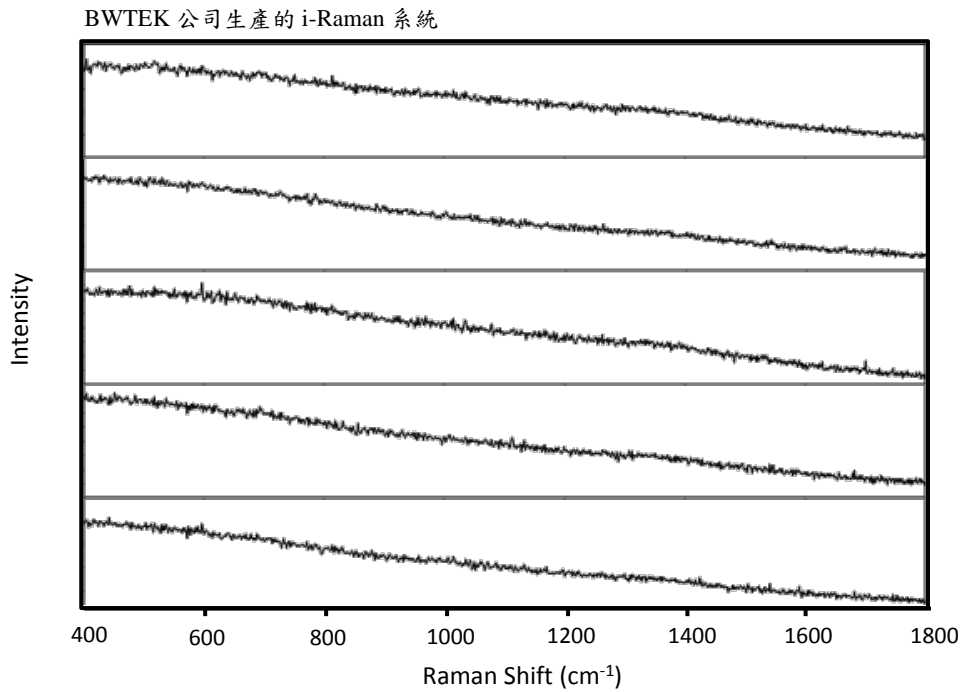
附錄 7 可攜式拉曼系統之 Ed2 強度標準差



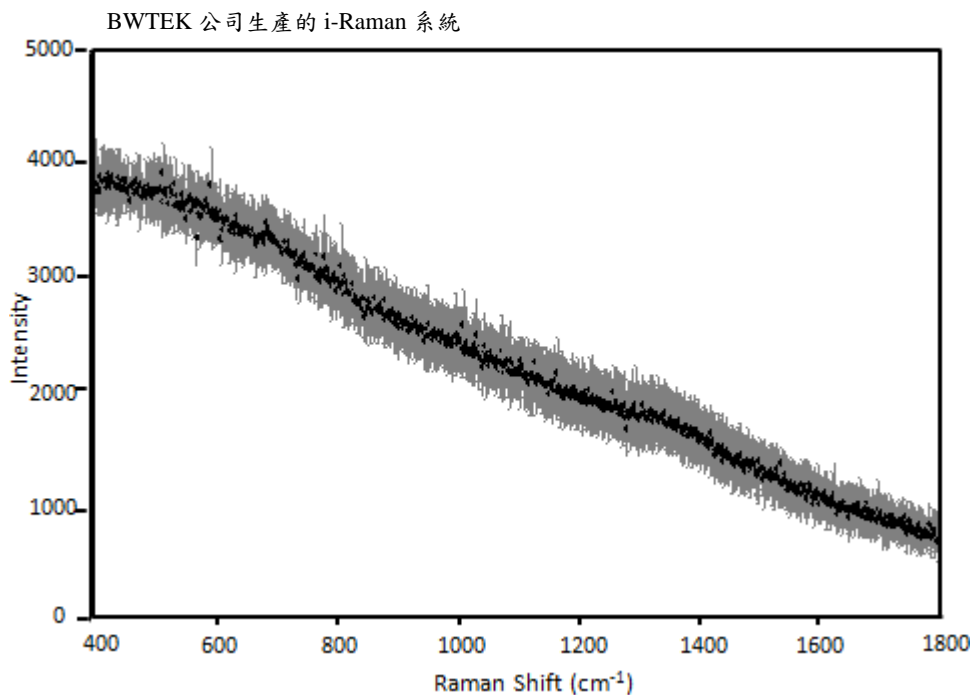
附錄 8 可攜式拉曼系統之 Ed2 平均光譜圖(N=5)



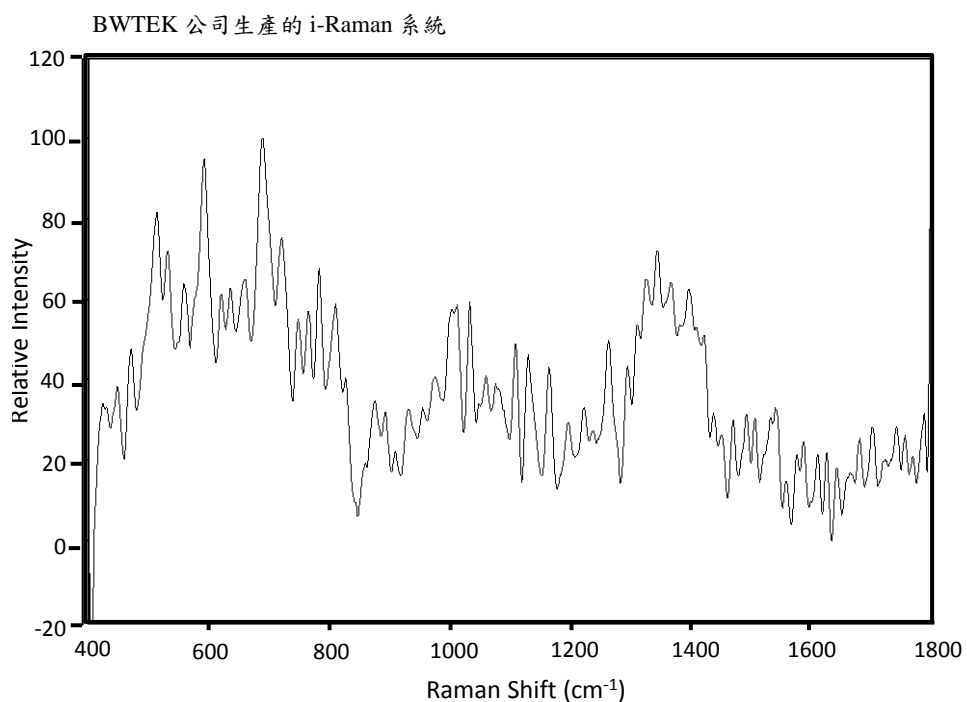
附錄 9 可攜式拉曼系統之 NK5 單一圖譜



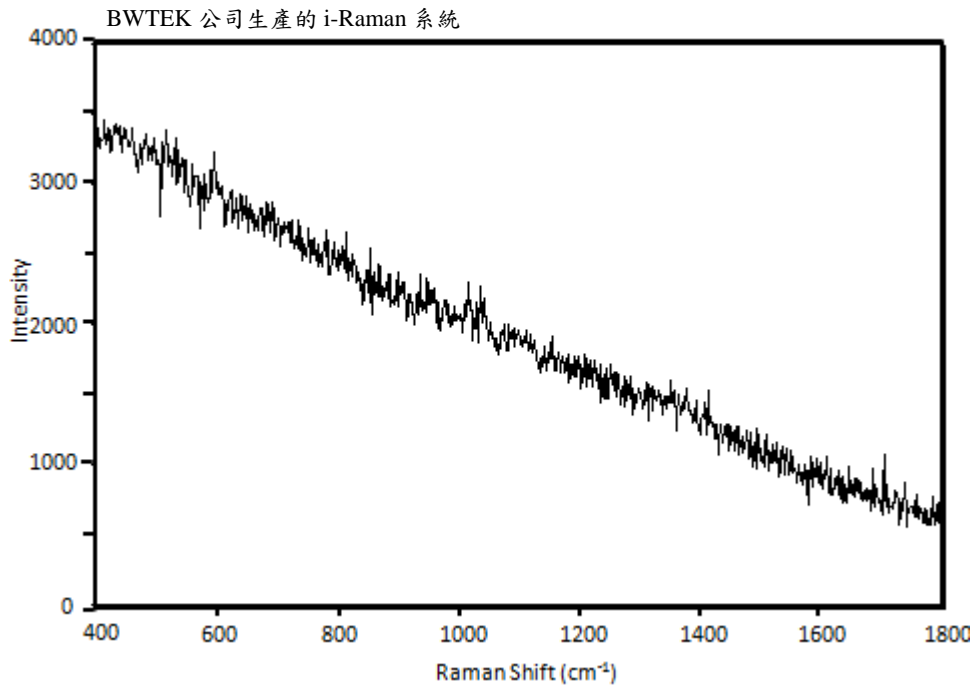
附錄 10 可攜式拉曼系統之 NK5 圖譜再現性特性(N=5)



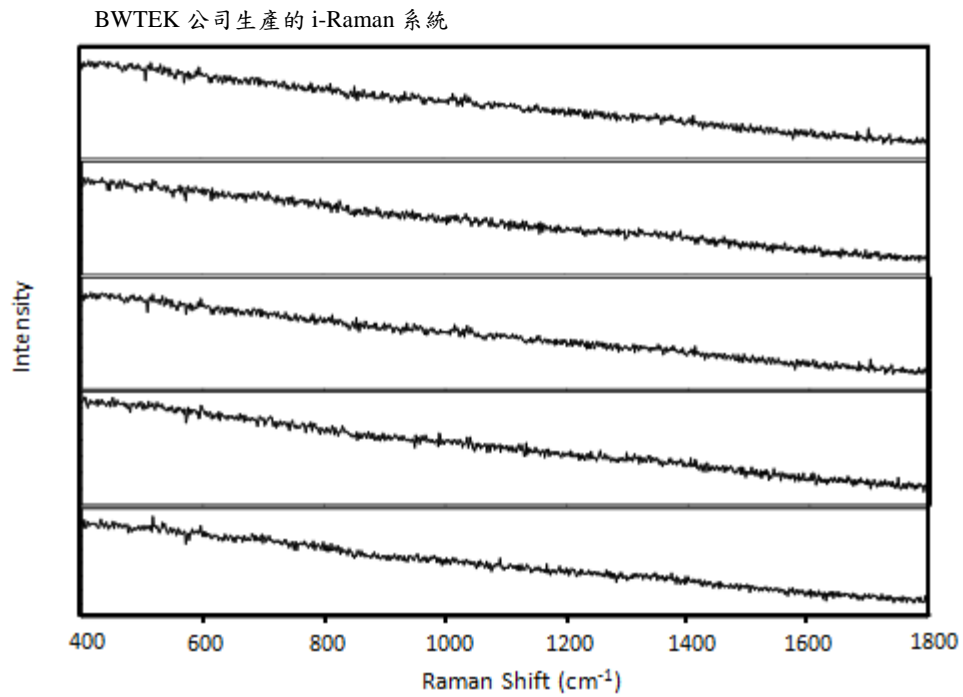
附錄 11 可攜式拉曼系統之 NK5 強度標準差



附錄 12 可攜式拉曼系統之 NK5 平均光譜圖(N=5)

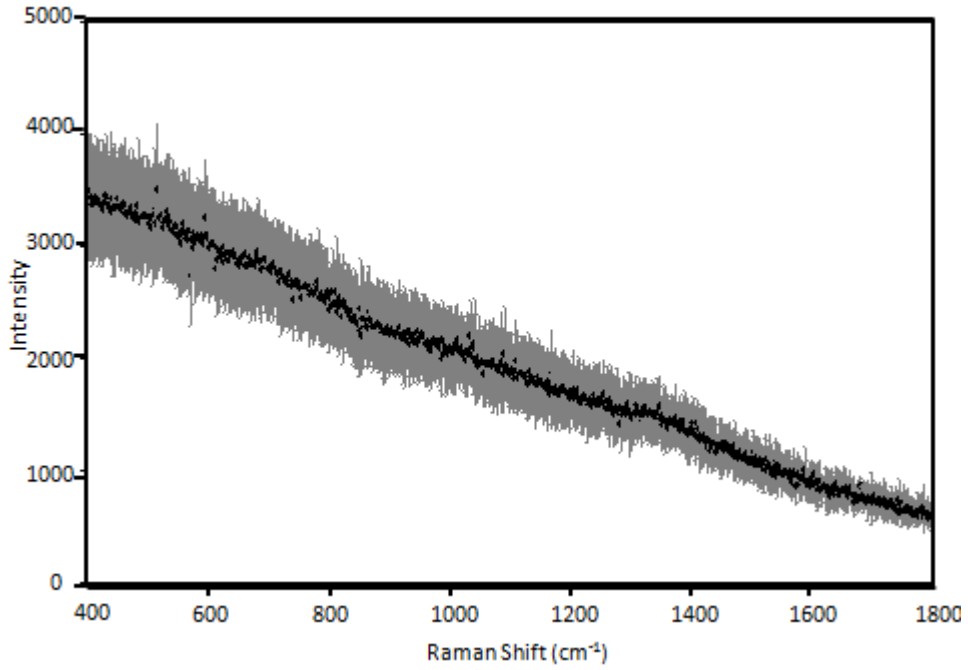


附錄 13 可攜式拉曼系統之 KM18 之五條單一圖譜



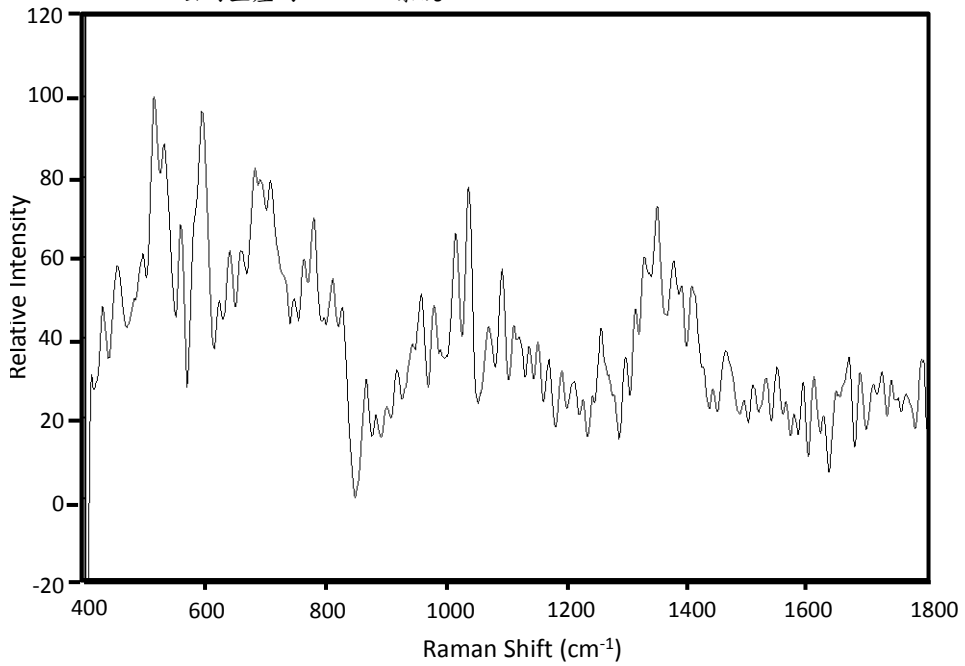
附錄 14 可攜式拉曼系統之 KM18 圖譜再現性特性(N=5)

BWTEK 公司生產的 i-Raman 系統

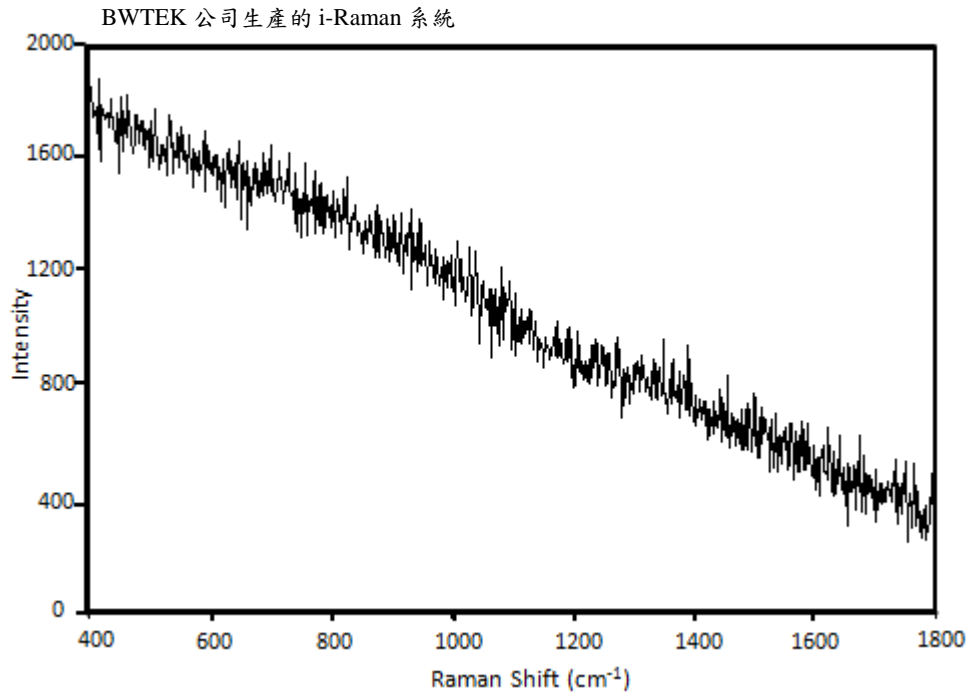


附錄 15 可攜式拉曼系統之 KM18 強度標準差

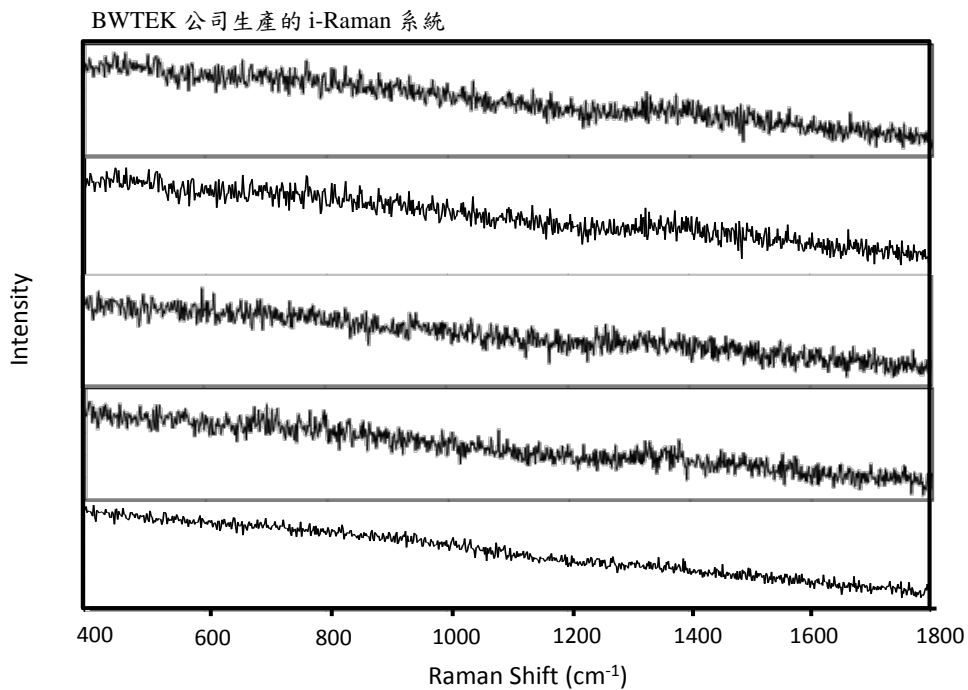
BWTEK 公司生產的 i-Raman 系統



附錄 16 可攜式拉曼系統之 KM18 平均光譜圖(N=5)

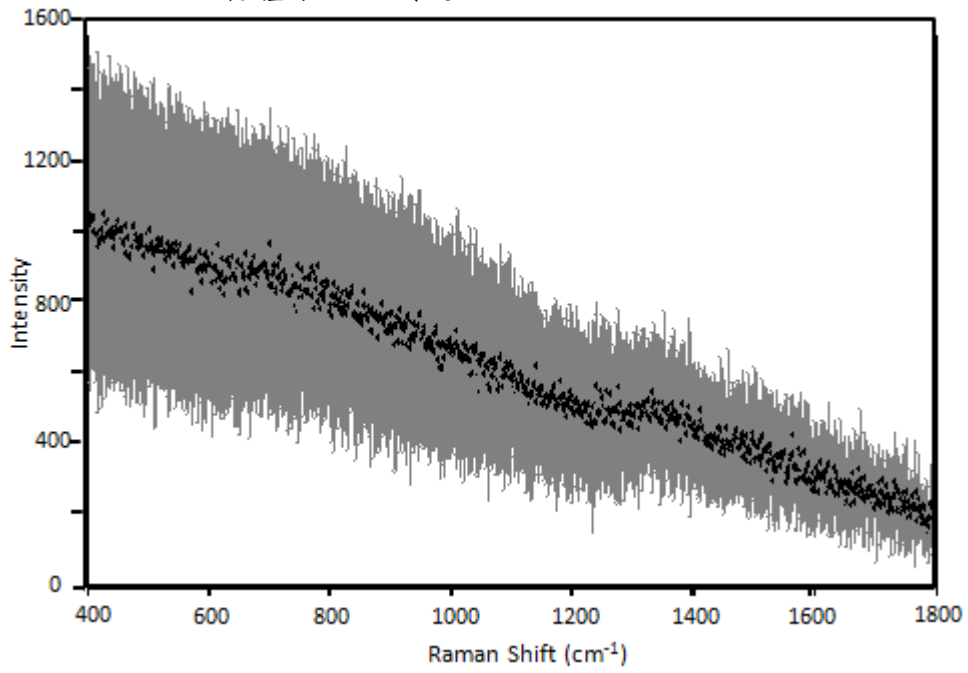


附錄 17 可攜式拉曼系統之 ϕL2 之五條單一圖譜



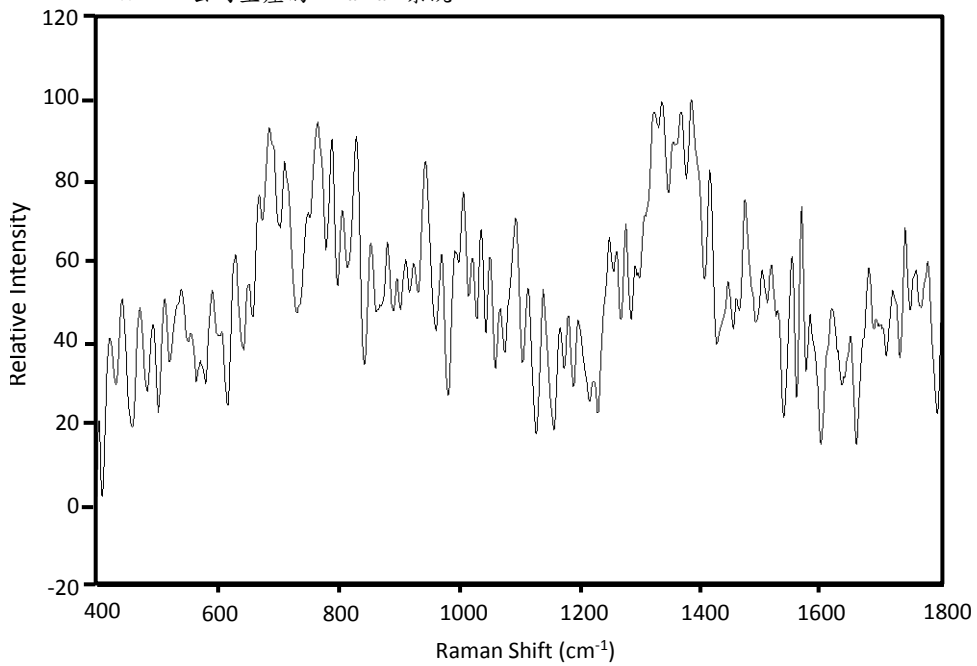
附錄 18 可攜式拉曼系統之 ϕL2 圖譜再現性特性(N=5)

BWTEK 公司生產的 i-Raman 系統



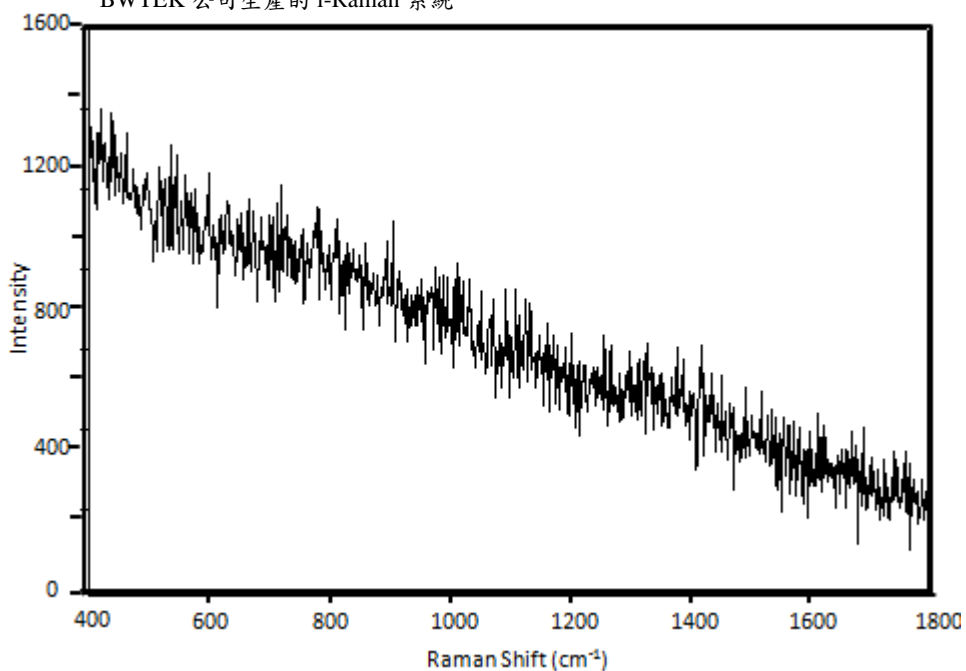
附錄 19 可攜式拉曼系統之 ϕ L2 強度標準差

BWTEK 公司生產的 i-Raman 系統



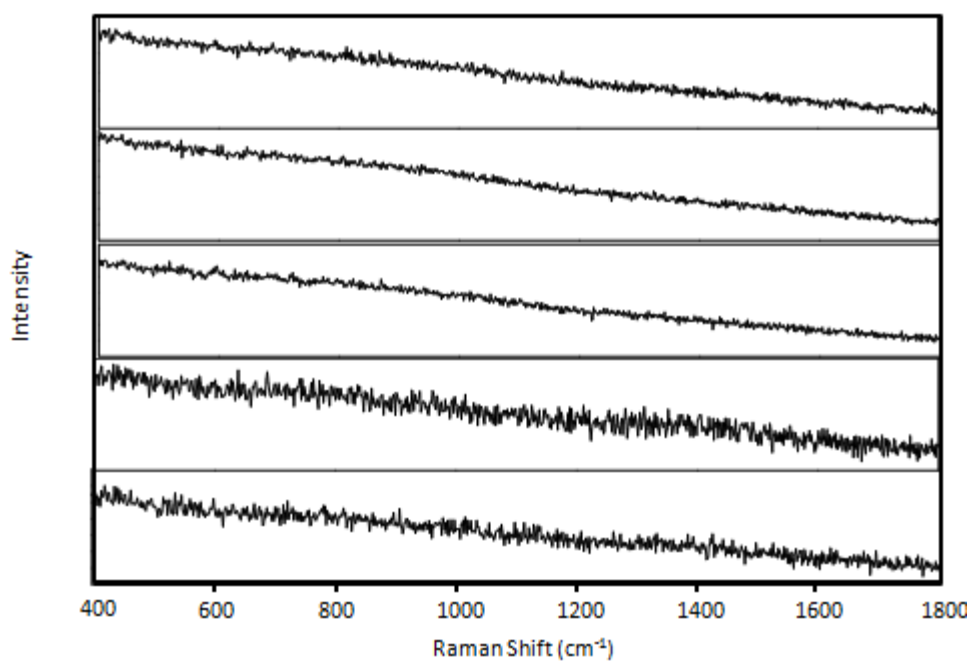
附錄 20 可攜式拉曼系統之 ϕ L2 平均光譜圖(N=5)

BWTEK 公司生產的 i-Raman 系統



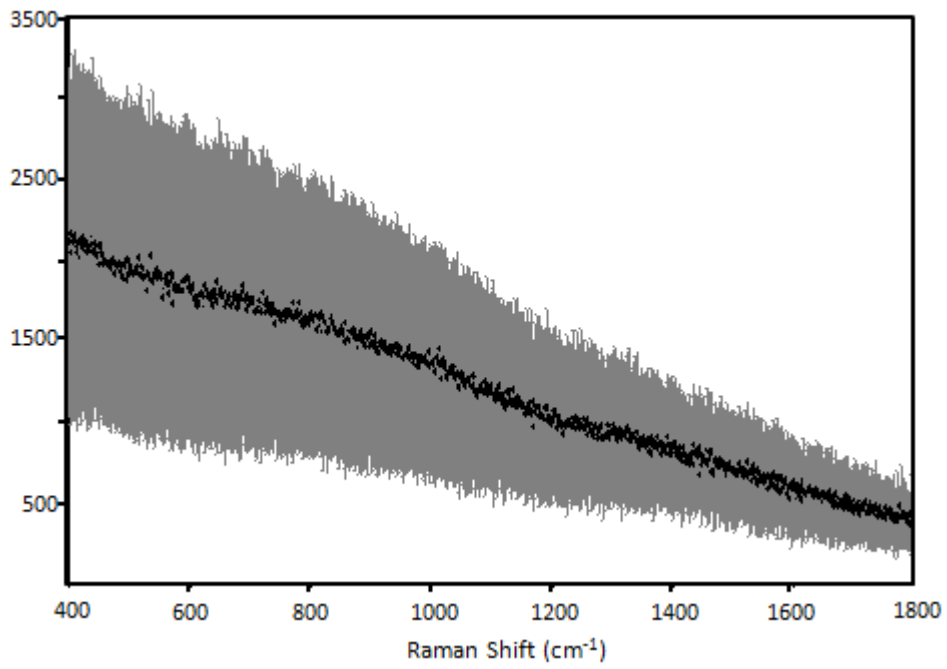
附錄 21 可攜式拉曼系統之 ϕ NK5 之五條單一圖譜

BWTEK 公司生產的 i-Raman 系統



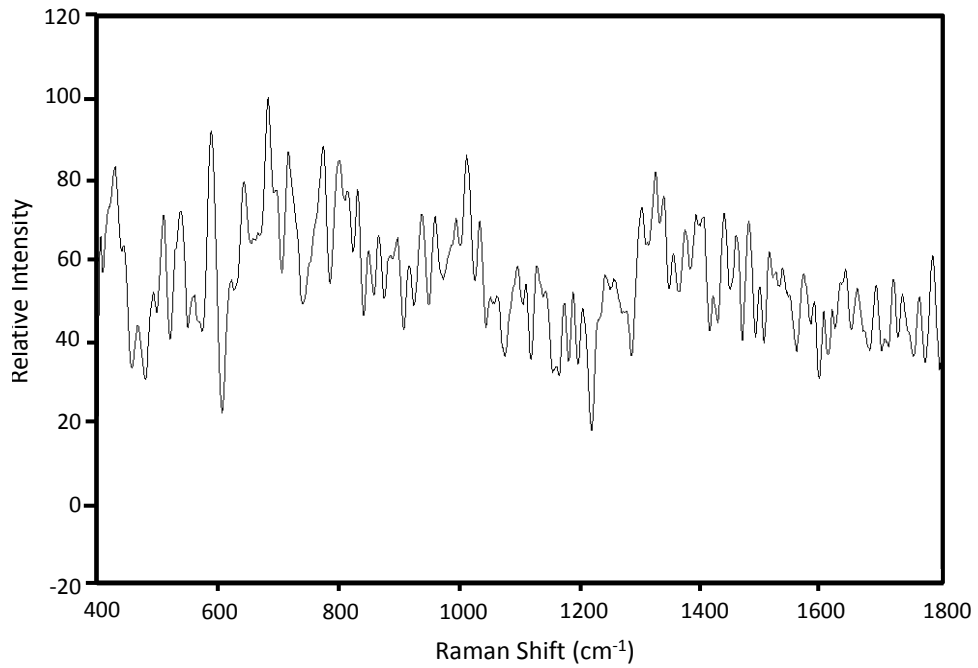
附錄 22 可攜式拉曼系統之 ϕ NK5 圖譜再現性特性(N=5)

BWTEK 公司生產的 i-Raman 系統

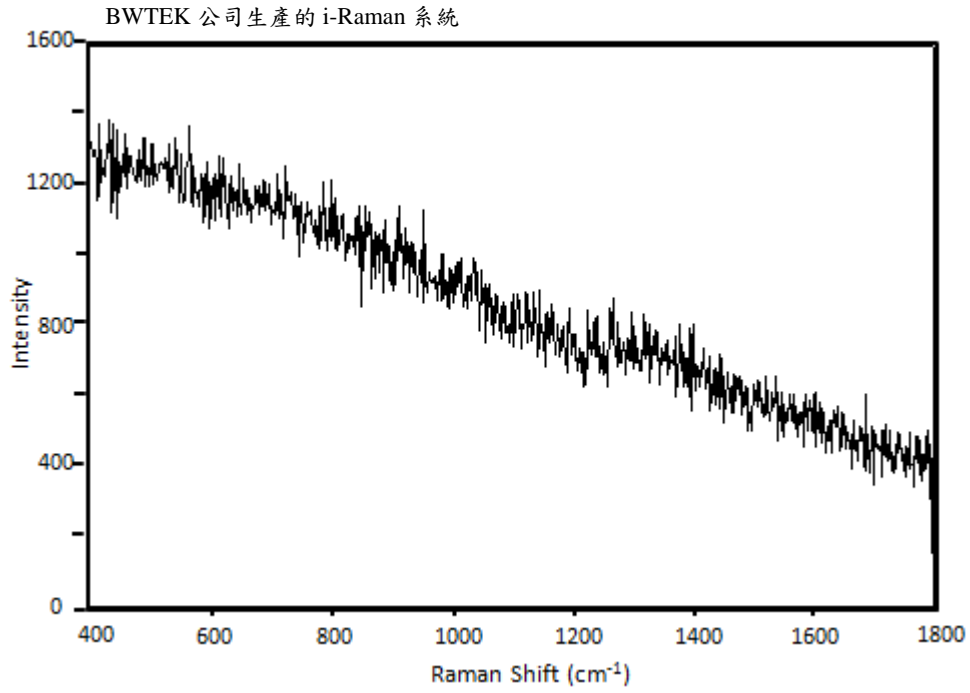


附錄 23 可攜式拉曼系統之 ϕ NK5 強度標準差

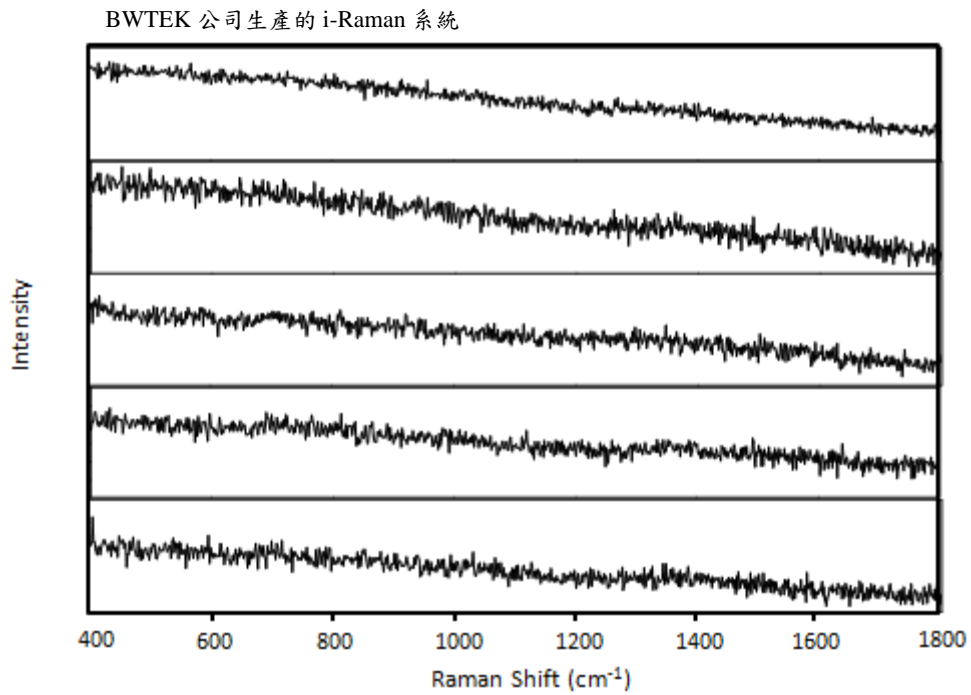
BWTEK 公司生產的 i-Raman 系統



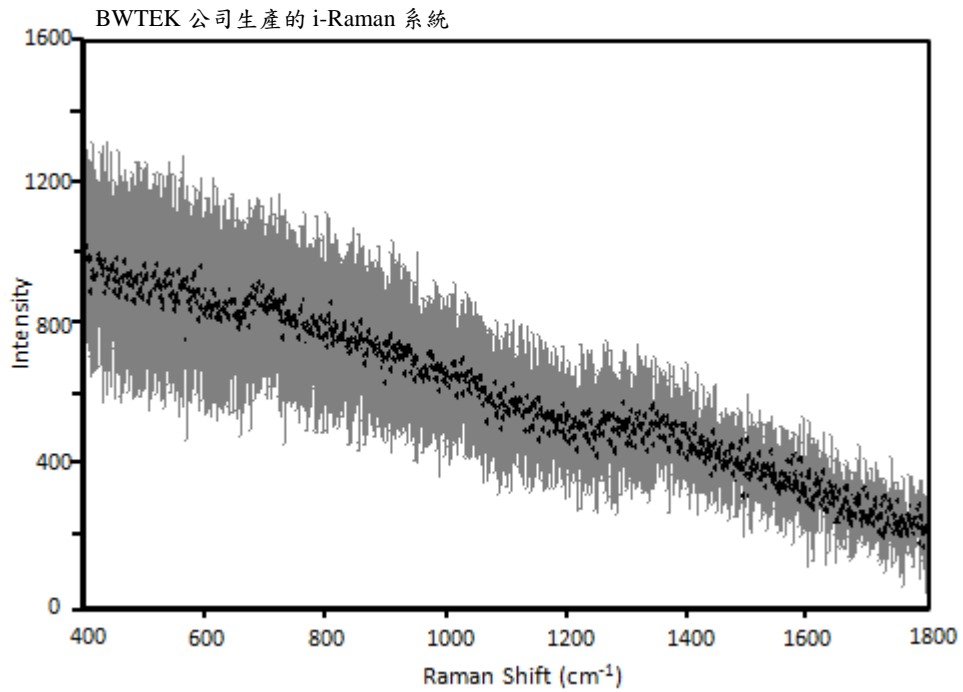
附錄 24 可攜式拉曼系統之 ϕ NK5 平均光譜圖(N=5)



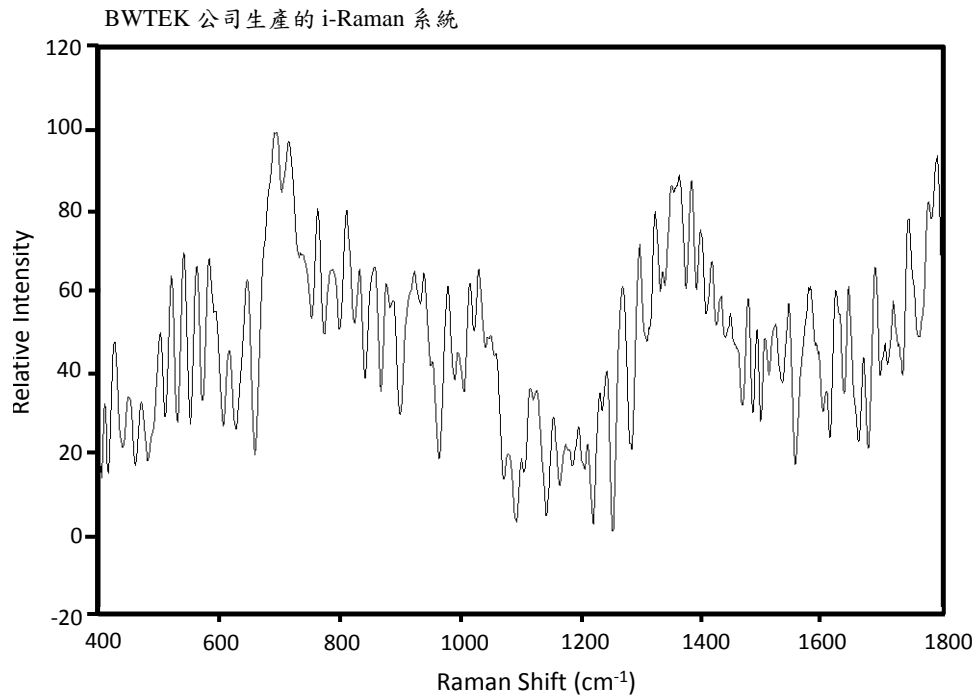
附錄 25 可攜式拉曼系統之 ϕKM18 之五條單一圖譜



附錄 26 可攜式拉曼系統之 ϕKM18 圖譜再現性特性(N=5)



附錄 27 可攜式拉曼系統之 ϕ KM18 強度標準差



附錄 28 可攜式拉曼系統之 ϕ KM18 平均光譜圖(N=5)

附錄 29 特徵峰整理[31-32, 56-60, 61, 62-67]

Raman Shift (cm ⁻¹)	碳水化合物	DNA/RNA	蛋白質	脂類
315		A		
432		C-O-P		
493	Man		Gly	
503		r	S-S str	
515	GlcNac		S-S str	
541			S-S, Trp	
548			Trp	
551	GlcNac			
564	GluA, Glc			
581		C, G	Trp	
583	Glc		Trp	
592			Gly	
596	Man	C		
602	Man			
610			Phe	
618			C-C 扭轉	
620			Phe	
631	GlcNac	r	Phe	
635			Tyr	
640			Tyr(C-C str), C-S str	
644			Tyr	
650			Tyr	
656		G		
658			C-S, 扭轉	
660		G, T	C-S str	
669	Man	G, T		
680		G		
703	GlcNac		C-S str	
710			C-S, 反式	
717			C-S str	
723		A		

728		A	C-S, 反式	PE, O-P-O 對稱伸縮 振動
736	GlcNac			
743	Man		Ile, Asn	
747		T		
751		C		
759		T	Trp, Val	
769	Glc, Man			
781		O-P-O 稱伸縮 振動, A, G, C		
782		U,C,T		
785		U,C,T		
814		O-P-O str	Asn	
821			Tyr	
828			Tyr	
832	Man		Tyr, Val	
843		B type		
851			Tyr	
853			Tyr	
859			Tyr	
866			proline	
872			Trp	PE, C-C 伸 縮振動, PC, CH ₂ 變 形
878			Trp	
880	β-C(1)構型, Man		Trp, Val	
885			Gly	
897		r		
902			C-C	
907	Man		C-C str	
918	Glc		proline	
922			C-C	
926	COH 彎曲		C-C str	
933	GlcNac		C-C str	
935			C-C str, CH ₃	

			def	
952	Man		C-C str	
959	Man		C-C str, CH ₃ def	
974	GlcNac, Man	r		
994	CH ₂			
1002			Phe	
1004		r	Phe	
1014		Trp		
1025	GlcNac, GluA, Glc	r, C-O 伸縮振 動		
1030			Phe	
1033			Phe	
1042	GlcNac, GluA			
1044			C-N str	
1048	C(1)-H 彎曲, Man, C-O, C-C, GlcNac	r	C-N str	
1050			C-C str	
1053	GluA, Glc	r, C-O 伸縮振 動		
1062				C-H
1066			C-N, Phe	
1070		O=P-O 對稱 伸縮振動		
1073	GluA, Glc, Man		C-N	PE, C-O C-O-C 對稱 伸縮振動
1080			Phe	
1089	COH 彎曲, C-O, C-C str	O=P-O 對稱 伸縮振動		C-C, 扭曲
1095		O-P-O ⁻		
1099		O-P-O ⁻		
1102	Man		C-N	
1106	Man	O=P-O		
1120	GluA, Glc		C-N	
1123	GlcNac, Man	C, U	C-N str	C-C, 反式
1126			Arg(C-C=N	

			str)	
1128			C-C, C-N str	C-C str
1132	Man			C-N str
1143	Man, GlcNac	r		
1150			C-C, C-N str	
1157		r	C-C, C-N str, CH ₃ def	
1178		G, A, C	Tyr	
1189	鹼基外 C-N 伸縮 振動			
1205	GluA, Glc, GlcNac		Tyr	
1209			Phe, Trp, C-C ₆ H ₅	
1226		A	amide III	
1232			amide III, β-折疊	
1237		U, C	amide III	
1239			amide III	
1247			amide III, 無 規捲曲	
1250		T, C, A	amide III	C-H
1257			amide III	
1260		C, A	amide III, 無 規捲曲	
1264			amide III	
1268			amide III	
1277	COH, Man		amide III (α-螺旋)	
1280			amide III, α-螺旋	
1295				C-H
1301				CH ₂
1303		C, A	amide III	
1308		A	amide III, β-回 折	
1322	GlcNac	G	C-H def	

1325		A		
1330	C(6)-H ₂ , CH ₃ , COH			
1335		A	Trp	
1337		A,G	C-H def	
1341		A	C-H def	C-H
1348	GluA, Glc, COH, Man			
1356			Trp	
1371	Glc			PC, CH ₂ 搖擺
1379	CH ₃ , GlcNac, Man	G, U, A	Phe	
1384		T, A, G	Typ	
1400		G	Asp	
1403	GluA, Glc			
1408	Man		CO ₂ ⁻ sym str	
1419		A, G		
1424		A, G		CH ₃ def
1433	GlcNac		Trp(N-H def)	
1440				C-H
1442		r		PE, PC, CH ₂ 剪切, CH ₂ 變形
1449	C-H def	A, G	C-H def	C-H def
1452				CH ₂ def
1456	GluA, Glc, Man		CH ₂ 彎曲	
1460	C-H def	A, G	C-H def	C-H def
1465		r		
1475		A, G		
1484		A, G		
1487		G, A		
1502		A		
1508		A		
1520		A		
1527		C		
1533		G, C		
1537		G		

1555	GlcNac (amide II)		Trp, amide II	
1572		G, A		
1578		G, A		
1581		G, A	Trp	
1584			Trp	
1597			Trp	
1607			Tyr, Phe	
1613			Tyr, Phe, Trp	
1617			Tyr	
1620	Man,	C=O str, U	Trp, Tyr, Phe	
1630	GlcNac			
1635	GlcNac(amide I)			
1644			amide I	
1654			amind I (α -helix)	
1657			amide I , α -螺旋	
1660		C=O str, U, G, C	amide I	
1665			amide I	
1667		T, C=O 伸縮 振動	amide I ,無規 捲曲,或 β -折疊	
1669			amide I	
1672			amind I (β -strand)	
1681			amide I , β -回折	
1725			C-O str	
1740				C=O
1754			C-H	
2541			S-H str	
2552			S-H str, Cys	
2557			S-H str	
2573			S-H str	
2578			S-H str, Cys	

2847				CH ₂ 對稱伸縮振動
2853				CH ₂ sym str
2877				CH ₂ 對稱伸縮振動
2883			C-H str	CH ₂ sym str
2900	C-H str			
2935	C-H str	C-H str	C-H str	C-H str
2979	C-H str	C-H str	C-H str	

附註：灰色區域為僅有單一細菌特有或沒有之特徵峰。

Phe- 苯丙胺酸；Tyr- 酪胺酸；Trp- 色胺酸；Val- 纈胺酸；Thr- 蘇胺酸；O-P-O- 磷酸；r- 脫氧核糖；A- 腺嘌呤；G- 鳥嘌呤；C- 胞嘧啶；U- 尿嘧啶；Man-D- 甘露糖；Glc-D- 葡萄糖；GlcNac-N- 乙醯基葡萄糖；str- 伸縮振動；sym- 對稱；asym- 反對稱；def- 變形。強度表示：S- 強；M- 中等；W- 弱。

參考文獻

1. Podschun, R., et al., *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 1998. 11(4): p. 589
2. Nordmann, P., et al., The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infectious Diseases*, 2009. 9(4): p. 228-236.
3. Yan, J.J., et al., Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying bla(IMP-8) in a university medical center in Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001. 39(12): p. 4433-4439.
4. Jawad, A., et al., Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp on dry surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996. 34(12): p. 2881-2887.
5. Cisneros, J.M., et al., Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clinical Microbiology and Infection*, 2002. 8(11): p. 687-693.
6. Hsueh, P.R., et al., Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerging Infectious Diseases*, 2002. 8(8): p. 827-832.
7. Berends, B.R., et al., Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. On pork carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, 1997. 36(2-3): p. 199-206.
8. Berends, B.R., et al., Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp in pigs. *International Journal of Food Microbiology*, 1996. 30(1-2): p. 37-53.
9. Sulakvelidze, A. , et al., Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001. 45(3): p. 649-659.
10. Ahmed, K., et al., Bacteriophage therapy revisited. *African Journal of Microbiology Research*, 2012. 6(14): p. 3366-3379.
11. Strauch, E., et al., Bacteriophages: New tools for safer food? *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit-Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 2007. 2(2): p. 138-143.
12. Cislo, M., et al., Bacteriophage Treatment Of Suppurative Skin Infections. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, 1987. 35(2): p. 175-183.
13. Slopek, S., et al., Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial-infections .1. general evaluation of the results. *Archivum*

- Immunologiae Et Therapiae Experimentalis, 1983. 31(3): p. 267-291.
14. Aebischer, A., et al., Structural and spectroscopic characterization of active sites in a family of light-emitting sodium lanthanide tetrafluorides. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2006. 45(17): p. 2802-2806.
 15. Puppels, G.J., et al., Description and performance of a highly sensitive confocal Raman microspectrometer. *Journal of Raman Spectroscopy*, 1991. 22(4): p. 217-225.
 16. Raman, C.V.K., et al., A new type of secondary radiation. *Nature*, 1928. 121 (3048): p. 501-502.
 17. Ellis, D.I., et al., Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. *Analyst*, 2006. 131(8): p. 875-885.
 18. Hanlon, E.B., et al., Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology*, 2000. 45(2): p. R1-R59.
 19. Tsuboi, M., et al., Raman Tensors and their application in structural studies of biological systems. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences*, 2009. 85(3): p. 83-97.
 20. Frank, C.J., et al., Raman-spectroscopy of normal and diseased human breast tissues. *Analytical Chemistry*, 1995. 67(5): p. 777-783.
 21. Haka, A.S., et al., Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. 102(35): p. 12371-12376.
 22. Caspers, P.J., et al., Combined in vivo confocal Raman spectroscopy and confocal microscopy of human skin. *Biophysical Journal*, 2003. 85(1): p. 572-580.
 23. Teh, S.K., et al., Near-infrared Raman spectroscopy for early diagnosis and typing of adenocarcinoma in the stomach. *British Journal of Surgery*, 2010. 97(4): p. 550-557.
 24. Teh, S.K., et al., Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the stomach: differentiating dysplasia from normal tissue. *British Journal of Cancer*, 2008. 98(2): p. 457-465.
 25. Min, Y.K., et al., 1064 nm near-infrared multichannel Raman spectroscopy of fresh human lung tissues. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2005. 36(1): p. 73-76.
 26. Short, K.W., et al., Raman spectroscopy detects biochemical changes due to proliferation in mammalian cell cultures. *Biophysical Journal*, 2005. 88(6): p. 4274-4288.
 27. Crow, P., et al., The use of Raman spectroscopy to identify and characterize

- transitional cell carcinoma in vitro. *Bju International*, 2004. 93(9): p. 1232-1236.
28. Chan, J.W., et al., Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells. *Biophysical Journal*, 2006. 90(2): p. 648-656.
 29. Puppels, et al., Raman Spectroscopic Method for Identification of Clinically Relevant Microorganisms Growing on Solid Culture Medium. *Analytical Chemistry*, 2000. 72, p. 12-19
 30. Singh, G.P., et al., Real-time detection of hyperosmotic stress response in optically trapped single yeast cells using Raman microspectroscopy. *Analytical Chemistry*, 2005. 77(8): p. 2564-2568.
 31. Singh, G.P., et al., The lag phase and G(1) phase of a single yeast cell monitored by Raman microspectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2006. 37(8): p. 858-864.
 32. Huang, Y.S., et al., Molecular-level investigation of the structure, transformation, and bioactivity of single living fission yeast cells by time- and space-resolved Raman spectroscopy. *Biochemistry*, 2005. 44(30): p. 10009-10019.
 33. Rosch, P., et al., The identification of microorganisms by micro-Raman spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 2003. 661: p. 363-369.
 34. Harz, M., et al., Direct analysis of clinical relevant single bacterial cells from cerebrospinal fluid during bacterial meningitis by means of micro-Raman spectroscopy. *Journal of Biophotonics*, 2009. 2(1-2): p. 70-80.
 35. Maquelin, K., et al., Rapid identification of *Candida* species by confocal Raman micro spectroscopy. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002. 40(2): p. 594-600.
 36. Buijtsels, P., et al., Rapid identification of mycobacteria by Raman spectroscopy. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008. 46(3): p. 961-965.
 37. Popp, J., et al., Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of the genus *Staphylococcus* and dependence on their cultivation conditions. *The Analyst*, 2005. 130: p. 8.
 38. Maquelin, K., et al., Rapid epidemiological analysis of *Acinetobacter* strains by Raman spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 2006. 64(1): p. 126-131.
 39. Goeller, L.J., et al., Discrimination of bacteria and bacteriophages by Raman spectroscopy and surface-enhanced Raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 2007. 61(7): p. 679-685.
 40. Blanch, E.W., et al., Molecular structures of viruses from Raman optical activity. *Journal of General Virology*, 2002. 83: p. 2593-2600.

41. Shanmukh, S., et al., Rapid and sensitive detection of respiratory virus molecular signatures using a silver nanorod array SERS substrate. *Nano Letters*, 2006. 6(11): p. 2630-2636.
42. Zhu, F.J., et al., Raman optical activity: A tool for protein structure analysis. *Structure*, 2005. 13(10): p. 1409-1419.
43. Barron, L.D., et al., Structure and behaviour of proteins, nucleic acids and viruses from vibrational Raman optical activity. *Spectroscopy-an International Journal*, 2003. 17(2-3): p. 101-126.
44. Overman, S.A., et al., Raman markers of nonaromatic side chains in an alpha-helix assembly: Ala, Asp, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Ser, and Val residues of phage fd subunits. *Biochemistry*, 1999. 38(13): p. 4018-4027.
45. Thomas, G.J. , et al., Raman spectroscopy of protein and nucleic acid assemblies. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 1999. 28: p. 1-27.
46. Short, M.A., et al., Changes in nuclei and peritumoral collagen within nodular basal cell carcinomas via confocal micro-Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 2006. 11(3).
47. Mirkin, C., et al., Nanoparticles with raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 2003. 225: p. U963-U964.
48. Duguid, J., et al., Raman spectral studies of nucleic-acids .44. Raman-spectroscopy of DNA-metal complexes .1. interactions and conformational effects of the divalent-cations - Mg Ca, Sr, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Pd, And Cd. *Biophysical Journal*, 1993. 65(5): p. 1916-1928.
49. Brahm, D.C.G. , et al., Form of DNA and the nature of interactions with protein in chromatin. *Nucleic Acids Res.*, 1978. 5: p. 835-850.
50. Moskovits, M., et al., Surface-Enhanced Spectroscopy. *Reviews of Modern Physics*, 1985. 57(3): p. 783-826.
51. Campion, A., et al., Surface-enhanced Raman scattering. *Chemical Society Reviews*, 1998. 27(4): p. 241-250.
52. Stiles, P.L., et al., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, in *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2008, Annual Reviews: Palo Alto. p. 601-626.
53. Filik, J., et al., Drop coating deposition Raman spectroscopy of protein mixtures. *Analyst*, 2007. 132(6): p. 544-550.
54. Zhang, D.M., et al., Chemical segregation and reduction of Raman background interference using drop coating deposition. *Applied Spectroscopy*, 2004. 58(8): p. 929-933.
55. Feofanov, A.V., et al., Confocal Raman microspectroscopy and imaging study

- of theraphthal in living cancer cells. *Biophysical Journal*, 2000. 78(1): p. 499-512.
56. Otto, C., et al., Confocal Raman microspectroscopy of the activation of single neutrophilic granulocytes. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 1998. 27(6): p. 582-589.
 57. Tsuboi, M., et al., Applications Of Infrared, Raman, And Resonance Raman-Spectroscopy In Biochemistry - Parker,FS. *Nature*, 1984. 310(5975): p. 345-345.
 58. Asher, S.A., et al., Raman-Spectroscopy In Biology - Principles And Applications - TU,AT. *Journal of the American Chemical Society*, 1983. 105(25): p. 7475-7475.
 59. Thomas, G.J., et al., Studies Of Virus Structure By Laser-Raman Spectroscopy .2. MS2 PHAGE, MS2 CAPSIDS AND MS2 RNA In Aqueous-Solutions. *Journal of Molecular Biology*, 1976. 102(1): p. 103-&.
 60. Hartman, K.A., et al., Studies Of Virus Structure By Raman Spectroscopy .1. R17 Virus And R17 RNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1973. 50(3): p. 942-949.
 61. Escoriza, M.F., et al., Raman spectroscopy and chemical imaging for quantification of filtered waterborne bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 2006. 66(1): p. 63-72.
 62. Xie, C., et al., Identification of single bacterial cells in aqueous solution using confocal laser tweezers Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 2005. 77(14): p. 4390-4397.
 63. Xie, C.G., et al., Cohfocal micro-Raman spectroscopy of single biological cells using optical trapping and shifted excitation difference techniques. *Journal of Applied Physics*, 2003. 93(5): p. 2982-2986.
 64. Maquelin, K., et al., Raman spectroscopic method for identification of clinically relevant microorganisms growing on solid culture medium. *Analytical Chemistry*, 2000. 72(1): p. 12-19.
 65. Benevides, J.M., et al., Polarized Raman spectroscopy of double-stranded RNA from bacteriophage phi 6: Local Raman tensors of base and backbone vibrations. *Biophysical Journal*, 1997. 72(6): p. 2748-2762.
 66. McCreery, R.L., et al., Raman Spectroscopy for Chemical Analysis. *Wiely Interscience*, 2000.

義守大學化工系 洪志勳老師

1. 論文中：
 - (1)微生物名稱表示方法錯誤，須更正
 - (2)細菌名稱要用大寫
 - (3)噬菌體文獻回顧引用資料年份錯誤(P.10)
 - (4) DNA 介紹及純化 ABHZ 相對溼度比較低的部分需再查明相關佐證文獻資料(P.27)
 - (5)研究設備須標明廠牌、型號與國家(P.32)
 - (6)此處之表格前後重複出現，建議刪去(P.35)

針對老師的這些問題，都已於論文文章中一一進行修正，感謝老師的指正。

2. 本研究中，使用於技術建立的細菌檢測量為 10^9 CFU/ml，但在臨床上菌量醫檢體不同通常僅有 10^{3-5} CFU/ml，甚至更低。因此是否本技術檢測之菌量濃度可以降低(如 10^5 CFU/ml)，方有使本技術應用於臨床檢測的可能性。

曾看過有文獻針對濃度為變因，利用拉曼光譜進行檢測，目前看到文獻最低可檢測範圍約 10^5 CFU/ml。在文獻中並無針對這些生物樣本進行拉曼光譜檢測，在此使用 10^9 CFU/ml 是為了嘗試此技術對這些生物樣本的可行性外，亦可先建立其指紋圖譜。

3. 抗藥性部份：抗藥基因有不同蛋白質，若是能進一步分析抗藥性菌株的特定蛋白質具有之特定峰，將有助於強化圖譜之應用範圍。

針對不同的抗藥基因之蛋白質部份，則需與生物領域的專家配合，若是能得到純化後的特定蛋白質進行光譜的檢測，則可將其與全圖譜進行比對並且標定特殊蛋白質之位置。

東海大學化材系 喬緒明老師

4. 論文中：
 - (1)須說明本研究使用之分析軟體為何？
 - (2) 研究部份光譜訊號採手動調降螢光背景方式，然確可能產生人為處理之誤差，是否可能利用電腦自動處理方式以避免上述差異產生？
 - (3) Error bar 呈現之標準差異極大，是否將修改後的圖譜再行統計標準差會更準確？

- (1) 針對老師的這些問題，都已於論文文章中進行修正，感謝老師的指教。
- (2) 然光譜部份利用首定調降螢光是由於拉曼系統之軟體無法降低其螢光，目前也與資工系石老師合作，看看是否能配合特定的程式，將螢光值統

一去除。

(3) 由於本研究並未針對細菌的某個特定的生長週期進行檢測，所以可能會同時含有處於不同生長週期的狀態，所以在此才將五張圖譜進行標準差作圖，以顯示出本研究中的圖譜之標準差。

5. 實驗中僅呈現桌上型和可攜式型光譜儀之訊號差異性，但卻無分析其不同與結果相似性，建議強化此部份之分析與討論。

根據此點，以將更進一步的比較和計算補充於 P.49，將 31 支明顯特徵峰挑出，並且計算重複之特徵峰比例，經計算後可攜式系統與桌上型高階系統比較約有 68% 之可信度。並再進一步進行針對重複之特徵峰進行誤差值計算。

6. 為什麼要使用桌上型與攜帶型兩套不同的系統去做？

兩套系統在目前使用上仍有其不同的定位，在本研究中，嘗試著比較兩套系統之差別。瞭解其差異程度，更可定位於適合應用之處。

7. 不同廠商製作出來的儀器是否不同？是否能整理桌上型與攜帶型的拉曼數據，相似度和可信度？

由於不同儀器，解析度會不大相同甚至所使用的軟體和光路其實不盡相同，甚至溫度也是造成誤差的一個重要原因，當溫度不同時可能會造成菱鏡角度不同，造成結果的差異。但是主要的特徵峰應該相距不遠。

東海大學化材系 楊怡寬老師

8. 論文中：(1) 光譜數據之平滑化處理的方式須描述清楚(P.41)

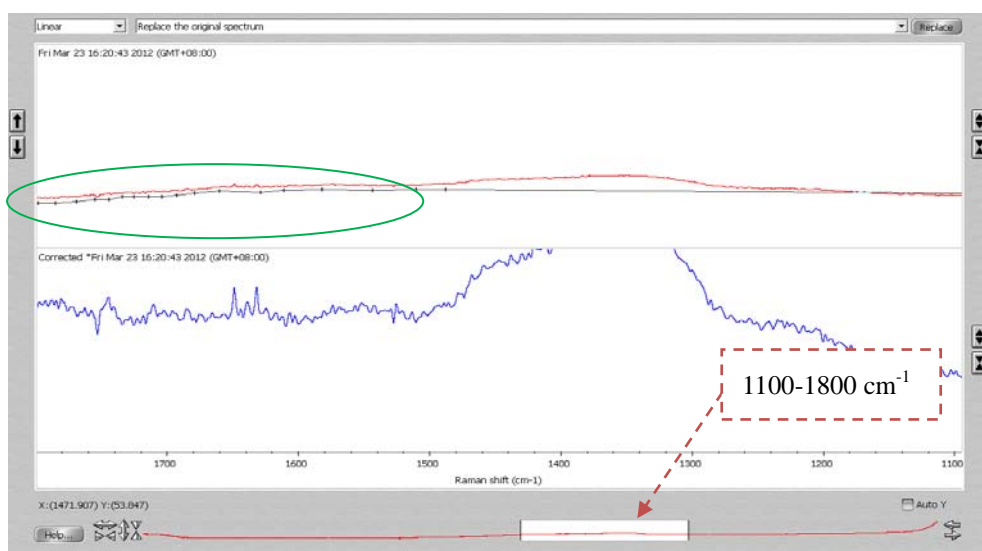
(2) Fig. 3-12 的圖 400~1800 cm^{-1} 的組合中，Y 軸有錯誤

(3) 結果與討論的圖，須說明或標註每張光譜圖是用何種系統獲得

(4) 以手動修正 baseline 部份亦須盡量描述清楚

(1) ~ (3) 針對老師的這些問題，都已於論文文章中進行修正，感謝老師的指教。

(4) 下圖為手動修去螢光值之截圖，本研究所收得知桌上型圖譜之 1100-1800 cm^{-1} 處皆會以手動方式去除螢光值，利用 OMNIC for Dispersive Raman 此軟體先將範圍固定，並且將軟體所給的線(黑)以節點方式貼近光譜圖(紅)，以綠色框圈出已固定結點的部份，並且會將所得結果呈現於下方圖譜(藍)，在此將每個節點之位置皆固定，盡可能使誤差減小。



9. 在 SERS 部份，是否會受顆粒影響、粒子大小和樣本影響?文中須進行討論及說明。

由於本批粒子並非由本實驗室自身合成，是透過合作所得，針對大小方面無法自行控制。若是未來有機會本實驗室能自行製作奈米粒子，則將會注意此變因。討論已補充於結論部份。

10. 結論中提及之 SERS 結語須修正，由於研究中使用之奈米粒子顆粒大小並非固定，雖然呈現增顯結果但卻無法下更明確之結論，因此僅能進行推論。

在此已根據結論再加以修改並且討論。

11. 部分噬菌體增顯後的光譜圖，在特定頻譜區域呈現波浪型訊號，是否為訊號呈現 overtone 結果?

不同尺寸和種類的奈米粒子會產生不同的表面電漿共振的能量，而此能量對不同強弱的分子運動模式能給予能量，會針對不同區域有所增顯。至於是否會產生 overtone 的結果，會再進一步進行查證。

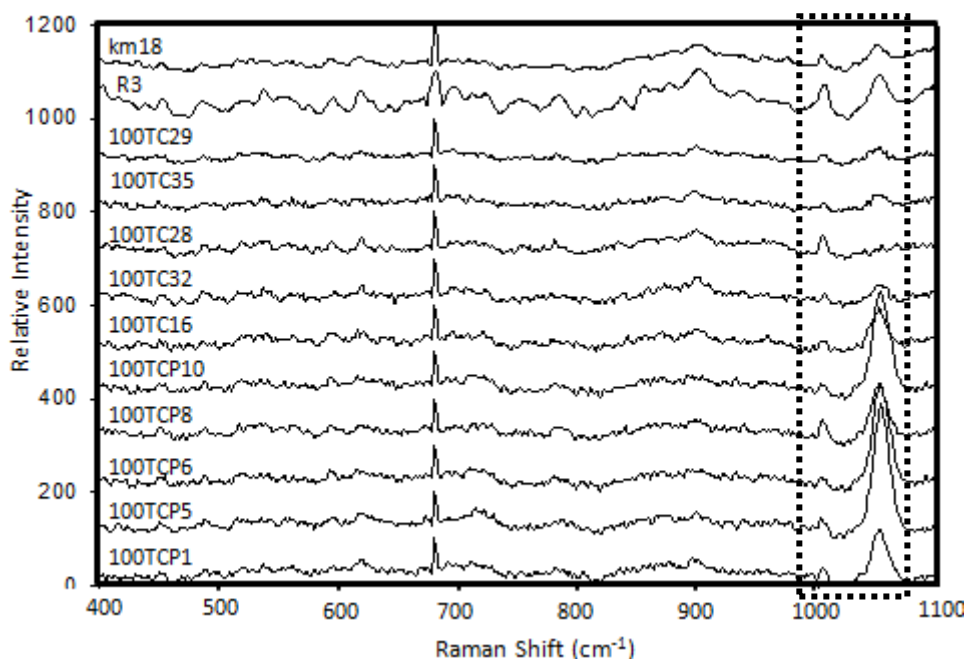
成功大學醫工所 張憲彰老師(口試招集委員)

12. 是否論文主體的辨別性，分類集中好比較清楚?例如將儀器比較移至附錄呈現

在此僅是將儀器系統更進一步的進行討論，而附錄中也放了另外兩株細菌和噬菌體之兩套系統的圖譜比較。

13. 建議實驗 Part II 部份是否能用同一支特徵峰進行標準化?以更有利於量測技術與光譜訊號之比對。

針對這個問題,由於一開始時是未知樣本,對於其圖譜分析皆為未知狀況下,所以並不知道針對哪支特徵峰作為標準化的基準較恰當,所以選擇使用整個圖譜中之最大強度之特徵峰作為基準再配合其抗藥性分析才找到其關聯性。但聽從老師建議後,也將圖譜做了些許的修改,呈現於於下圖,以 680 cm^{-1} 作為標準,便於分析 1002 及 1048 cm^{-1} 之比例。



14. 不同儀器獲得之光譜訊號差異頗大,能否說明其原因?此外未來如何與國際其他研究或是不同系統間之結果進行比較?

如前面所說,其實每台儀器在解析度、軟體和光路其實不盡相同,甚至溫度也是造成誤差的一個重要原因,當溫度不同時可能會造成結果的差異,甚至準備樣本的方式、pH 值的調控甚至檢測條件皆不盡相同,這些皆有影響最後圖譜差異的可能,但主要是特徵峰位置應會相似。

東海大學化材系 林其昌老師(指導教授)

15. 對喬老師的問題,須要再進一步的對兩套系統進行討論及比較其差異性,必須要重新整理數據。
16. 針對楊怡寬老師對粒子大小的問題,在下結論的部份則不能如此強烈。
17. 針對抗藥性菌株結果分析部分,須與微生物領域學者討論,進一步從藥學特性分析,始能獲得並了解抗藥性菌株與光譜指紋間之關連性,也更有亦於抗藥性微生物之快速分型與檢測。

個人資料

姓名:張嘉紋

戶籍地：台南市

聯絡信箱：smile945429@hotmail.com

畢業學校：東海大學 化學工程與材料學系 學士
東海大學 化學工程與材料學系 碩士



個人學術相關發表與參與計畫如下：

國際期刊：

1. Chi-Chang Lin*(林其昌), Chih-Hsun Hung*, **Chia-Wen Chang (張嘉紋)**, Li-Rong Hunag, Rapid Discrimination of Bacteria and Bacteriophages by Raman Spectroscopy, D1034, Applied Mechanics and Materials (EI)

國際學術會議：

1. C.-C. Lin*(林其昌), C.-H. Hung*, **C.-W. Chang (張嘉紋)**, L.-R. Huang, Rapid discrimination of bacteria and bacteriophages by Raman spectroscopy, the 2nd International Conference on Engineering and Technology Innovation 2012 (ICETI 2012), Nov. 02-06, 2012, NCKU, Tainan, Taiwan (口頭發表)
2. C.-C. Lin*(林其昌), C. H. Hung*, **C.-W. Chang (張嘉紋)**, L.-R. Huang, Bacteria and bacteriophage discrimination by Raman spectroscopy, ACCS 2011, 14-17 Nov 2011, Taipei, Taiwan (口頭發表)

國內學術會議：

1. 林其昌*、郭明澤、劉信佑、**張嘉紋**、張憲彰，「拉曼光譜於眼表液體之分析」，醫學工程研討會暨年會，99年12月10-11日，義守大學燕巢分部 (最佳海報獎)
2. Chi-Chang Lin* (林其昌), Yan-Fu Chen, **Jia-Wen Chang (張嘉紋)**, Hsien-Chang Chang, 「A Novel Immunoassay Based on Bi-functional Nanoparticles SERS analysis」，第29屆台灣區觸媒與反應工程研討會，O-H3，100年6月23, 24日，東海大學化學工程與材料工程學系 (口頭發表)
3. 林其昌*、郭明澤、洪志勳、劉信佑、**張嘉紋**、張憲彰，「可供臨床微生物感染快速檢測之拉曼光譜分析平台」(NSC 99 - 2218 - E - 029 - 004)，醫學工程研討會，100年8月18-21日，成功大學醫學工程所(口頭發表)

4. 張嘉紋、林其昌*，「Rapid discrimination of bacteria and bacteriophages by Raman spectroscopy」第十七屆化學感測器學術研討會，2012年05月19日，明道大學，苗栗(口頭發表)

參與國科會與校內計畫：

1. 國科會計畫「可供臨床微生物感染快速檢測之拉曼光譜分析平台」(國科會計畫編號：NSC 99-2218-E-029 -004 -執行期限：99年8月1日至100年7月31日)(主持人：林其昌)(計畫參與人員：張嘉紋)
2. 國科會計畫「結合奈米金屬複合濾材與拉曼光譜於臨床感染微生物光譜指紋之快速分析」(國科會計畫編號：NSC 100-2320-B-029-001 執行期限：2011.08.01 至 2012.07.31)(主持人：林其昌)(計畫參與人員：張嘉紋)
3. 東海大學 99 學年度「系所重點發展計畫」2010.08 至 2011.07 (主持人：林其昌)(計畫參與人員：張嘉紋)
4. 東海大學 100 學年度「系所重點發展計畫」2011.08 至 2012.07 (主持人：林其昌)(計畫參與人員：張嘉紋)